

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**A IMPORTÂNCIA DA AVIFAUNA SELVAGEM
NA PERSPETIVA *ONE HEALTH***

Inês Sofia Madeira Duarte

Orientador

Professor Doutor Paulo Martins da Costa

Co-Orientador

Dr. Ricardo Brandão

Porto 2018

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**A IMPORTÂNCIA DA AVIFAUNA SELVAGEM
NA PERSPETIVA *ONE HEALTH***

Inês Sofia Madeira Duarte

Orientador

Professor Doutor Paulo Martins da Costa

Co-Orientador

Dr. Ricardo Brandão

Porto 2018

Resumo

O CERVAS, Centro de Estudos, Recuperação e Vigilância de Animais Selvagens, localizado em Gouveia, funciona como um hospital para a vida selvagem e tem como principal objectivo “solucionar problemas associados à conservação e gestão das populações de animais selvagens e dos seus habitats”, tendo um papel importante na conservação da biodiversidade da região e na educação ambiental da população. Algumas das atividades realizadas no decorrer do estágio incluem recepção dos animais ingressados, tratamento das suas lesões, realização de necrópsias, limpeza e manutenção das instalações e participação em ações de educação ambiental.

Para além da aquisição de novos conhecimentos e competências na área Clínica de Fauna Selvagem, foi ainda desenvolvido um estudo de suscetibilidades antimicrobianas em isolados de *Escherichia coli* e *Enterococcus*, provenientes de zaragatoas cloacais de aves selvagens que ingressaram no CERVAS. Os estudos da prevalência das resistências antimicrobianas em indicadores de contaminação fecal, como a *E. coli* e os *Enterococcus spp.*, realizadas em bactérias fecais de diferentes populações humanas e animais, bem como no ambiente, torna possível a comparação de perfis e a identificação de potenciais vias de transmissão de genes de resistência entre humanos e animais.

A análise das 41 amostras recolhidas serve para expor o elevado número de resistências a antimicrobianos encontradas em aves selvagens, que nunca terão estado em contacto direto com estes agentes. No global, 55% dos isolados de *E. coli* e 70% dos *Enterococcus* isolados, apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico. As resistências manifestadas com mais frequência pela *E. coli* foram à ampicilina, estreptomicina, tetraciclina e à combinação de trimetoprim com sulfametoxazol. Para o género *Enterococcus*, as resistências mais frequentes foram à tetraciclina, à combinação de quinopristina e dalfopristina, à rifampicina e à eritromicina. Foi ainda identificada, em três espécimes, a presença de *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL – *Extended Spectrum Beta Lactamase*).

Agradecimentos

Aos meus pais, avós e irmã, dedico este trabalho, pelo apoio incansável e amor incondicional.

Ao Professor Paulo Costa, um enorme obrigada pelo acompanhamento e por todos os conhecimentos que me transmitiu ao longo do curso.

Ao Dr. Ricardo Brandão e à Enfermeira Daniela Costa, agradeço pela hospitalidade, confiança e momentos de aprendizagem que me proporcionaram.

Para o Francisco, vai a minha gratidão, por poder tê-lo do meu lado.

Um grande obrigada à Dona Elisabete, Joana e Patrícia, pela ajuda no laboratório, e a todos os estagiários e voluntários que me acompanharam estes últimos meses, por tornarem esta experiência inesquecível.

Para o Alfa.

Abreviaturas e Acrónimos

ANA	Aeroportos e Navegação Aérea - Aeroportos de Portugal
APT	Água Peptonada Tamponada
CDC	Centro de Controlo e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América
CERVAS	Centro de Ecologia, Recuperação e Vigilância de Animais Selvagens
CFB	<i>CampyFood Broth</i>
CRAM	Centro de Recuperação de Animais Marinhos
DGAV	Direção-Geral da Alimentação e Veterinária
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
ESBL	β -Lactamases de Espectro Alargado
GNR	Guarda Nacional Republicana
HEA	Meio <i>Hektoen Enteric Agar</i>
h	Horas
ICNF	Instituto de Conservação da Natureza e Florestas
KAA	Meio <i>Kanamycin Aesculin Azide</i>
m	Metros
MH	Meio <i>Mueller-Hinton</i>
MIU	Teste Motilidade, Indol, Urease
mL	Mililitros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Metilcilina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PNSE	Parque Natural da Serra da Estrela
SB	Agar <i>Slanetz e Bartley</i>
SEPNA	Serviço de Proteção da Natureza e Ambiente
TBX	Meio <i>Tryptone Bile X-glucuronide</i>
TSI	Meio <i>Triple Sugar Iron</i>
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistentes à Vancomicina
μL	Microlitros
°C	Graus Celsius

Índice

Resumo	i
Agradecimentos	ii
Abreviaturas e Acrónimos.....	iii
CAPÍTULO I – O estágio.....	1
1. Introdução	1
2. Atividades realizadas	3
2.1. Atividades relacionadas com os animais ingressados	3
2.2. Limpeza e manutenção das instalações.....	5
2.3. Ações de educação ambiental.....	6
3. Casuística.....	7
CAPÍTULO II – Avifauna selvagem na perspetiva <i>Uma Saúde</i>.....	9
1. Introdução	9
2. Caso de interesse: suspeita de Tuberculose Aviária em marrequinhas-americanas	10
3. Estudo de suscetibilidades antimicrobianas em isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus</i>, provenientes de zangaratoas cloacais de aves selvagens.....	13
3.1. Breve história dos antibióticos e da emergência das resistências antimicrobianas	13
3.2. Espécies bacterianas estudadas: <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus</i>	16
3.3. Objetivo e Amostra	18
3.4. Métodos e Materiais	18
3.5. Resultados e Discussão	22
3.6. Conclusão.....	26
Bibliografia.....	28
Anexos	31
Figuras	31
Tabelas	36

CAPÍTULO I – O estágio

1. Introdução

O presente relatório descreve as atividades executadas no decorrer do estágio curricular, entre os dias 8 de Janeiro de 2018 e 27 de Abril de 2018, no âmbito do plano de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, pertencente à Universidade do Porto.

O local de estágio foi o Centro de Ecologia, Recuperação e Vigilância de Animais Selvagens (CERVAS) localizado na cidade de Gouveia, tendo contado com a orientação do Prof. Dr. Paulo Costa e coorientação do Dr. Ricardo Brandão.

O CERVAS foi criado em 2004 e pertence ao Parque Natural da Serra da Estrela (PNSE), estando sob a gestão da associação Aldeia desde 2009. Encontra-se igualmente inserido na Rede Nacional de Centros de Recuperação para a Fauna, dirigida pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF)²⁵. Conta com o apoio da ANA - Aeroportos de Portugal, diversas outras entidades parceiras e com fundos reunidos por meio de donativos, apadrinhamentos de animais em recuperação e dinamizando atividades como *workshops* sobre os mais variados temas. Este local funciona como um hospital para espécies animais selvagens autóctones mas o seu alcance vai muito além do impacto direto que tem nos animais reabilitados.

O principal objetivo do CERVAS é “detetar e solucionar diversos problemas associados à conservação e gestão das populações de animais selvagens e dos seus habitats”³⁸. Nesta perspetiva, não só atuam mais diretamente na recuperação de animais selvagens feridos ou debilitados e na realização de necrópsias aos animais que ingressem já sem vida ou que morram durante o processo de recuperação, como também participam em projetos como o *Programa Antídoto – Portugal*, para o combate ao uso ilegal de venenos, o *Projeto BARN – Conservação e Estudo da Distribuição e Ecologia das Aves de Rapina Noturnas*, e no apoio á comunidade científica através de parcerias com universidades e na formação dos estagiários que recebem. Outra vertente de enorme importância é a realização de ações de sensibilização e educação ambiental, para crianças, estudantes, agentes de autoridade e população em geral, chamando a atenção para a grande importância da fauna selvagem que nos rodeia, para as práticas que põem em causa essa mesma biodiversidade e demonstrando os procedimentos a adotar (ou não adotar) quando se encontra um animal selvagem. Foi realmente extraordinário ver o número de pessoas e

animais abrangidos pelo trabalho e missão do CERVAS.

Desde 2006, já receberam 4530 animais, 3271 dos quais, vivos, e libertaram 2016, o que representa uma taxa de sucesso de 61%.

A equipa do CERVAS é constituída pelo Coordenador e Médico Veterinário, Dr. Ricardo Brandão, e pela Enfermeira Veterinária Daniela Costa. A esta equipa juntam-se os múltiplos voluntários e estagiários, nacionais e estrangeiros, de várias áreas de estudo que participam na manutenção do centro. Entre a equipa de trabalho e os voluntários, acaba por se desenvolver uma relação simbiótica já que, se a primeira beneficia de um aumento dos recursos humanos, sempre muito bem-vindos, a segunda adquire novos conhecimentos e competências, para além de ter a oportunidade de contactar com animais selvagens e de contribuir na sua reabilitação.

O CERVAS tem à sua disposição a Casa da Torre no centro de Gouveia, onde existem várias salas de exposições, um auditório, uma pequena loja e escritórios, que permite a realização de visitas, *workshops* e outras ações de educação ambiental longe dos animais em recuperação. As instalações clínicas situam-se nos arredores da cidade, numa zona pouco perturbada pela atividade humana e adjacente ao Parque Ecológico de Gouveia. As instalações que aqui se encontram são a enfermaria, a sala de internamento, um laboratório, um escritório e área de refeições, uma zona de recepção e educação ambiental, uma sala de criação de ratos (biotério) e uma sala de necrópsias. Todos estes espaços encontram-se suficientemente afastados das instalações exteriores – jaulas para passeriformes, 8 câmaras de recuperação (2x3m), 2 câmaras de recuperação longas (1,5x8m), 4 câmaras de muda (6x6m) e 1 túnel de voo (10x30m) – para que se possam realizar as atividades do quotidiano sem perturbar os animais em recuperação.

Quem visita o CERVAS percebe que o desenho das instalações exteriores é na sua maioria feito para acomodar a classe de animais que mais nele ingressa: as aves, seja pela dimensão das câmaras, a escolha dos materiais, o tipo de enriquecimento ambiental, a existência do túnel de voo para aves de maiores dimensões e de caixas-ninho nas câmaras de muda. São mantidas nas instalações exteriores algumas aves que tenham lesões que as impeçam de ser libertadas, designadas de irrecuperáveis - caso de um mocho-d'orelhas (*Otus scops*) e de uma coruja-do-nabal (*Asio flammeus*) - que são bastante úteis na sociabilização dos animais em recuperação, particularmente das crias ou em casos de cativeiro prolongado.

2. Atividades realizadas

Devido à época do ano em que decorreu o estágio, o número de ingressos de animais vivos não foi muito extenso, pelo que o contacto com animais em recuperação foi reduzido. A maioria do tempo era ocupado com tarefas relacionadas com a manutenção e limpeza do centro e com a realização de necrópsias.

Os vários tipos de atividades realizadas podem ser agrupados em 3 categorias: atividades relacionadas com os animais ingressados, limpeza e manutenção das instalações e ações de educação ambiental.

2.1. Atividades relacionadas com os animais ingressados

Quando um novo animal ingressa, com vida, no CERVAS, existe um conjunto de procedimentos que têm de ser respeitados e executados para que se reúna o máximo de informação relativa ao paciente, na tentativa de atingir o sucesso na sua reabilitação. Esses procedimentos baseiam-se na realização de uma anamnese para a obtenção de informações, tais como onde foi encontrado o animal, em que circunstâncias, a sintomatologia que apresentava, a sua reação ao ser apanhado e qualquer outra informação que possa ser útil na determinação da causa de ingresso. Os animais são normalmente recolhidos e entregues por agentes do Serviço de Proteção da Natureza e Ambiente, o SEPNA, uma das atribuições da GNR, e acompanhados por um guia de entrega. Serão estes agentes a reunir essa informação e transmiti-la ao médico veterinário. O que aumenta a importância da formação dos agentes do SEPNA, já que são um elo fundamental entre quem encontra os animais e os centros de recuperação.

Antes sequer de tirarmos o animal da caixa de cartão onde normalmente são transportados, existem alguns dados que nos podem fornecer informação adicional como vocalizações, a posição em que o animal se encontra, cor das fezes, estado das penas ou pelagem, algum cheiro distinto ou presença de fluídos corporais como sangue. Depois de reunir toda esta informação podemos proceder à manipulação dos animais para a realização do exame físico.

Como estes pacientes são animais selvagens, alguns deles com espinhos, garras, bicos ou dentes capazes de provocar sérias lesões a quem os manipula, é de extrema importância assegurar a segurança de todos, sendo necessária uma correta contenção do animal. Na maioria das situações basta uma boa contenção física com recurso a toalhas e luvas. Noutros casos, mais frequentemente em mamíferos, pode ser necessário recorrer à contenção química para a realização do exame físico. Infelizmente, no decorrer deste estágio curricular, não assisti a

nenhuma destas situações.

O exame físico começa com a pesagem e observação geral do animal, que passa pela observação dos olhos, narinas, boca ou bico, ouvidos, ânus ou cloaca, pelagem ou penugem e pele, de modo a encontrar alguma lesão claramente visível. De seguida, passamos à palpação dos ossos e massas musculares, onde tentamos localizar qualquer anomalia, seja esta uma assimetria, luxação, fratura ou alteração na amplitude dos movimentos, e avaliamos a condição corporal. Podemos ainda recorrer a métodos complementares de diagnóstico como o oto ou oftalmoscópio, microhematócrito, refratómetro para avaliação quantitativa das proteínas plasmáticas, esfregaços sanguíneos, exames coprológicos ou radiografias. Os exames complementares que realizei, ou vi realizar, durante o estágio foram coprologias (método de *Willis*) e esfregaços de fígado por aposição. O número reduzido de exames complementares realizados deve-se ao facto de a maioria das causas de ingresso serem de origem traumática e de fácil identificação.

Caso seja necessário, e enquanto estiver a ser sujeito a intervenções médicas, o animal permanecerá numa jaula no internamento. As intervenções mais frequentemente realizadas nos animais internados foram o controlo do peso, alimentações com sonda ou à mão (Figura 3), limpeza e desinfeção de feridas, colocação ou troca de talas e ligaduras, tratamento tópico de lesões, limpeza e reparação das penas com água quente, colocação de protetores de cauda em aves e eutanásias. A manipulação dos animais internados era feita toda de uma só vez e era normalmente a primeira tarefa realizada no início do dia de forma a minimizar o tempo passado no internamento e, portanto, o stress causado aos animais.

Quando o animal acaba os tratamentos a que esteve sujeito no internamento passa para as instalações exteriores onde lhe é dada a oportunidade de se exercitar e de se alimentar com mais autonomia, até porque antes de terminar o seu percurso no CERVAS, os seus tratadores têm de ter a certeza de que o animal possui as capacidades necessárias para sobreviver na natureza. Os animais são colocados nas diferentes câmaras exteriores consoante o seu tamanho, estado de recuperação, espécie e compatibilidade entre espécies. O túnel de voo é indispensável para o treino do voo em aves de grande porte como abutres, grifos e grandes águias. As intervenções realizadas aos animais que estão no exterior são pesagens e troca de instalações. Como a captura dos animais nesta fase está dificultada pelo tamanho das instalações, tem de se recorrer à utilização de redes ou laços.

A recuperação de um animal chega ao fim com a sua devolução à natureza. Antes da sua libertação o animal é pesado, é feito o registo das suas biometrias – no caso das aves as

dimensões do bico, cera, cabeça, asa, terceira pena primária e comprimento, largura e profundidade do tarso - e é colocado algum tipo de identificação individual. A identificação no caso das aves é por meio de uma anilha metálica ou colorida, mas esta pode ser acompanhada por uma marca alar ou uma mochila com emissor de GPS em determinadas espécies de maior interesse.

No caso de o animal morrer durante a sua recuperação, ou no caso de ter ingressado já sem vida, tem de se proceder à realização de uma necrópsia para, se possível, determinar a causa de morte. Estes animais são pesados, fotografados e são registadas as suas biometrias (Figura 4). As biometrias a registar nas aves são as mesmas que as enumeradas no parágrafo anterior, e em mamíferos, registamos as dimensões da cabeça, corpo com e sem cauda, garrote e superfície plantar. Depois de realizada a necrópsia, são embalados, identificados e congelados os seguintes órgãos dos animais necropsiados: coração, pulmões, trato gastrointestinal, fígado, rins e diafragma de mamíferos. Para alguns estudos mais específicos que estavam a ser realizados por outros estagiários recolhemos ainda músculo e cérebro de vários animais e penas, unhas e bicos de aves insectívoras.

No decorrer do estágio realizei 97 necrópsias (Figura 5) a 36 espécies diferentes, e as causas e lesões associadas mais frequentemente encontradas foram trauma (fraturas, rotura de fígado, baço e diafragma), debilidade (baixa condição corporal, vesícula biliar dilatada, pigmento verde na moela) e indeterminada (muitos apresentavam apenas lesões pouco evidentes como hematomas, congestão pulmonar ou hepática mas sem perda de condição corporal, fraturas ou sinais de parasitismo).

2.2. Limpeza e manutenção das instalações

Existem várias tarefas que têm de ser executadas diariamente para manter os espaços limpos e impedir a transmissão de agentes entre animais. A limpeza das jaulas dos internados e dos materiais e instalações utilizados tinha que ser executada diariamente, mas a maioria dos esforços concentravam-se em tarefas semanais. Estas incluíam uma limpeza mais profunda das instalações, limpeza das câmaras exteriores quando ficavam desocupadas, a troca e limpeza de todos os comedouros e bebedouros e a manutenção do biotério.

O biotério, ou “sala de criação de ratos”, é composta por 60 caixas com grupos familiares, cada uma com 2 ou 3 fêmeas, um macho e as suas ninhadas, e por 2 caixas de engorda onde os ratos são separados por sexo. O objetivo é a criação de uma fonte de alimento semelhante ao que as

aves encontram na natureza e fornecimento de alimento vivo aos animais que se encontram em fase de treino de caça, no fim da sua reabilitação. A manutenção deste espaço inclui a limpeza de todas as caixas e bebedouros, substituição de reprodutores que tenham morrido, colocação das crias mais velhas nas engordas e distribuição de nova alimentação. Os bebedouros e comedouros são vigiados ao longo da semana e enchidos de acordo com a necessidade.

A alimentação dos animais carnívoros, quase a totalidade dos animais em recuperação na altura do meu estágio, era fornecida diariamente e preparada quinzenalmente. Através de uma das suas parcerias, o CERVAS recebe carregamentos de coelhos mortos inteiros provenientes de uma exploração cunícula local. Estes são eviscerados, preparados em pedaços de grandes ou pequenas dimensões, com ou sem pele, para satisfazer as necessidades das várias espécies animais, e congelados em doses.

2.3. Ações de educação ambiental

Uma vertente muito importante do trabalho prestado por um centro de recuperação passa pelo desenvolvimento de ações de educação ambiental, tentando alcançar o número máximo possível de pessoas.

As atividades em que tive a oportunidade de participar foram a Exposerra em Gouveia entre os dias 9 e 13 de Fevereiro, a 7ª edição do *Workshop* de Aves Invernantes da Serra da Estrela nos dias 17 e 18 de Fevereiro, 2º Passeio de Observação de Aves do *Aspiring Geopark Estrela*, em Belmonte no dia 24 de Março, visita de alunos de Enfermagem Veterinária da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, a 4 e 5 de Abril, a 24ª edição do *Workshop* Prático de Recuperação de Animais Silvestres que decorreu na Escola Superior Agrária de Coimbra nos dias 13, 14 e 15 de Abril e a visita de alunos de Medicina Veterinária da Escola Universitária Vasco da Gama em Coimbra, no dia 20 de Abril. O CERVAS participou ainda noutras atividades como palestras e *workshops* na ilha da Madeira, Aveiro e Lisboa. Algumas das atividades em que pude participar encontram-se representadas na Figura 6, nos Anexos.

Das 19 libertações de animais que ocorreram durante as 16 semanas de estágio, muitas foram utilizadas como um momento de ensino e sensibilização, já que eram convidados a participar os padrinhos, particulares ou agentes que encontraram os animais, crianças e estudantes, aproveitando também situações de maior exposição pública como a celebração do 30º aniversário da elevação de Gouveia a cidade. Tanto quanto possível os animais eram devolvidos nos locais onde foram encontrados, em particular na época de reprodução. Quando isto não era possível, era

selecionado um local adequado à espécie em questão.

Outras atividades em que pude participar foram os censos de garça-branca-grande (*Casmerodius albus*), apanha e plantação de bolotas e preparação de material biológico a partir de crânios, membros e caudas de animais necropsiados, para adicionar à osteoteca utilizada nas ações de educação ambiental (Figura 7).

3. Casuística

Durante as 16 semanas de estágio ingressaram 81 animais, numa média de 5 ingressos por semana. A classe taxonómica mais representada foi a classe das Aves, com 84% do total, ou 68 ingressos de 28 espécies diferentes. A classe *Mammalia* representou 16% dos ingressos com 13 animais de 7 espécies diferentes.

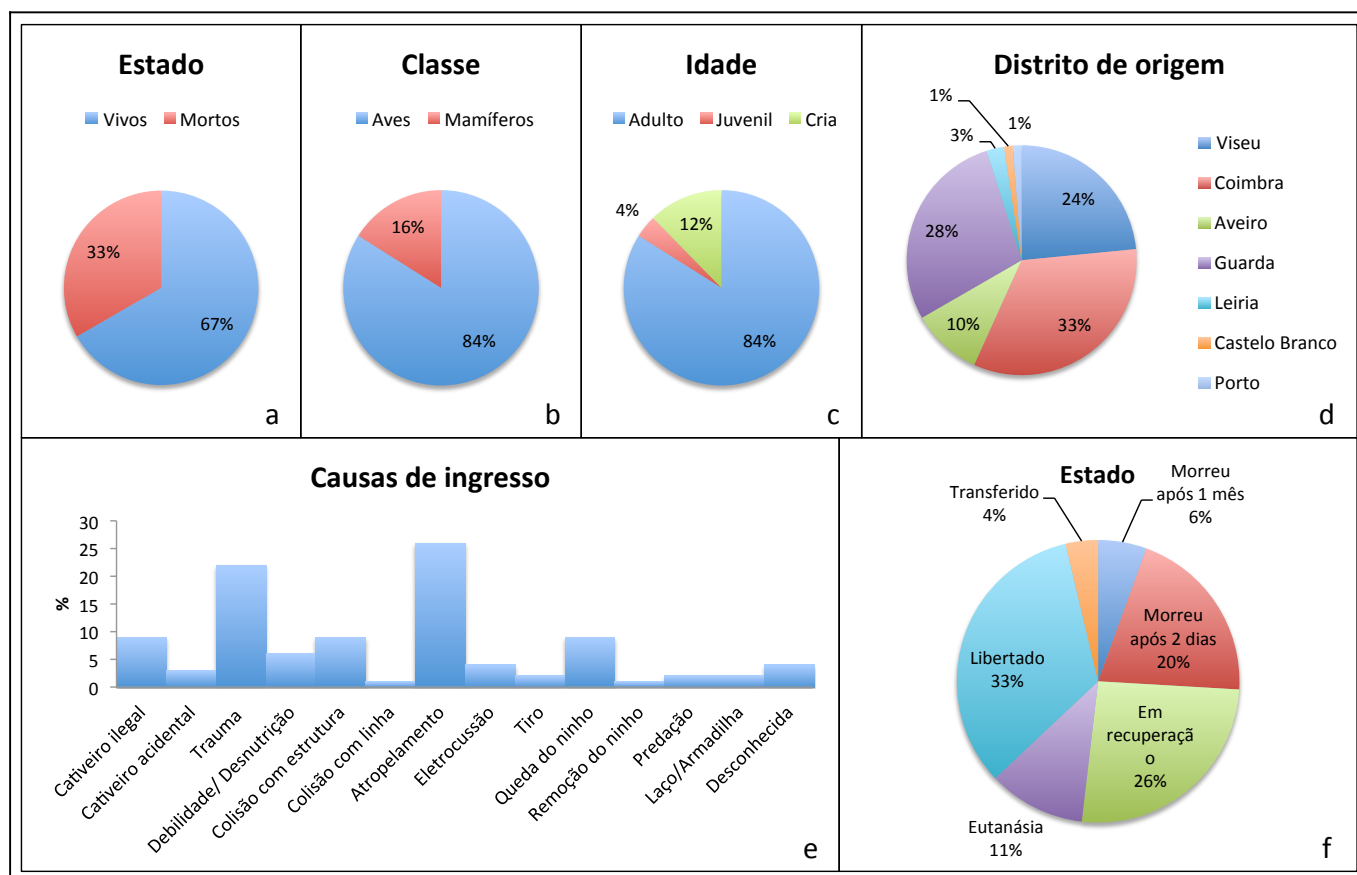


Figura 1: Casuística dos ingressos. Representação gráfica do estado vital (a), classe taxonómica (b), idade (c), distrito de origem (d) e causa dos ingressos (e) e o estado dos ingressos vivos (f).

As 28 espécies de aves acima referidas pertencem a 13 famílias taxonómicas diferentes. Destas, as com maior representatividade são a *Accipitridae*, (25%), *Strigidae* (24%), *Tytonidae* (13%) e *Corvidae* (10%). As espécies que mais contribuíram para estes valores foram a águia-d'asa-redonda (*Buteo buteo*) e o gavião (*Accipiter nisus*), pertencentes à família *Accipitridae*, a coruja-das-torres (*Tyto alba*) e a coruja-do-mato (*Strix aluco*), pertencentes às famílias *Tytonidae* e *Strigidae* respetivamente, e a gralha-preta (*Corvus corone*), que pertence à família dos corvídeos. A maioria dos ingressos de mamíferos pertencem à família *Mustelidae* (54%), sendo o texugo-europeu (*Meles meles*) a espécie animal mais frequente. Os restantes 56% encontram-se distribuídos pelas famílias *Canidae* (raposas), *Suidae* (javali), *Leporidae* (coelhos-bravos), *Erinaceidae* (ouriços) e *Vespertilionidae* (morcegos comuns).

A grande maioria dos ingressos foi de animais adultos (84%) devido à estação do ano, mas com o início da primavera começaram também os ingressos de crias (12%) (Figura 1.c). A principal causa de ingresso foi o trauma, mais especificamente: atropelamento (26%), trauma de origem desconhecida (22%), colisão com estrutura (9%), eletrocussão (4%), tiro (2%) e predação (2%). Outras causas com alguma representatividade são a queda do ninho (9%), cativeiro ilegal (9%) e a debilidade ou desnutrição (6%). Estas e as restantes causas de ingresso encontram-se expostas na Figura 1.e. Um terço do total de ingressos foram animais mortos (Figura 1.a), recolhidos e entregues pela GNR.

Dos 54 ingressos vivos, um terço foi devolvido à natureza no decorrer do estágio, 26% ainda se encontravam em recuperação, 20% morreram nos primeiros 2 dias, 11% foram eutanasiados (normalmente casos de fraturas complicadas), 6% morreram no espaço de 1 mês e 4% foram transferidos (Figura 1.f). Estes 4% representam os casos de uma gaivota-tridáctila (*Rissa tridactyla*) e de uma pega-rabuda (*Pica pica*), que foram transferidas para outros centros mais especializados na sua recuperação, o CRAM – Centro de Reabilitação de Animais Marinhos em Quiaios e para o Parque Ecológico de Gouveia, respetivamente.

É de notar a vasta área de ação do CERVAS, já que recebeu animais de 7 distritos diferentes (Figura 1.d). Os distritos de origem mais representados foram Coimbra (33%), Guarda (28%) e Viseu (24%). Recebeu ainda animais de Aveiro (10%), Leiria, Porto e Castelo Branco.

CAPÍTULO II – Avifauna selvagem na perspetiva *Uma Saúde*

1. Introdução

Numa altura em que se sentem permanentemente os efeitos da globalização, a saúde não podia ser exceção. Esta saúde global é uma combinação das saúdes humana, animal e ambiental, a uma escala mundial, e de todos os fatores que as influenciam. E enquanto médicos veterinários, temos grandes responsabilidades na manutenção desta *Uma Saúde*.

Uma Saúde (One Health) é definida pelo CDC (Centro de Controlo e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos) como uma abordagem multidisciplinar que envolve parcerias entre as áreas da medicina, veterinária, saúde pública e ecologia, a nível local, nacional e global, com o objetivo de atingir a melhor saúde global possível. Este conceito assenta no facto de existirem doenças que podem ser transmitidas entre humanos e animais, as zoonoses, que por sua vez são influenciadas pelo meio ambiente. Desta maneira, atuar em apenas uma das vertentes da *Uma Saúde* não é suficiente e, por outro lado, as más práticas de uns têm consequências à escala global. A emergência de novas doenças e o reaparecimento de doenças que se pensavam extintas, devido a múltiplos factores como as alterações climáticas, o aumento da população, o crescente contacto entre pessoas e animais e a movimentação global de pessoas, animais e bens, são também responsáveis pela crescente necessidade desta intervenção a nível global³⁹.

Nesta perspetiva, é inegável a importância do estudo dos animais, sejam estes de companhia, produção ou selvagens. Para além de serem hospedeiros e agentes de disseminação de agentes patogénicos, acabam por servir também de sinalizadores de doenças que possam afetar o ser humano³⁹. Para além da aposta na investigação científica, a abordagem da *Uma Saúde* passa também pela implementação de programas, legislação e partilha de dados epidemiológicos e laboratoriais entre investigadores e restante população⁴².

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), existem três áreas em que esta abordagem é particularmente importante: a segurança alimentar, o controlo de zoonoses e as resistências antimicrobianas. Importante notar que as resistências podem ser, por sua vez, manifestadas tanto por agentes zoonóticos, como por agentes causadores de doenças de origem alimentar.

As aves selvagens são vetores e reservatórios de múltiplos agentes patogénicos que podem afetar o ser humano e outros animais. A sua ação enquanto reservatórios é excelente já que têm grande proximidade às atividades humanas e facilidade em atravessar vários habitats. A transmissão

destas infecções ao ser humano pode ser direta (contacto direto com uma ave infetada) ou indireta (através de vectores como mosquitos e carraças transportados pelas aves ou do contacto com água ou alimento contaminado com fezes de aves infetadas)³³. O estudo das aves selvagens já assumiu papéis de grande importância, como foi o caso de um surto do vírus da influenza aviária A altamente patogénica (HPAI – da sigla em inglês) nos Estados Unidos em 2014²⁸, o caso do vírus de *West Nile*, da borreliose (*Borrelia burgdorferi* transmitida por carraças) e da tularémia (*Francisella tularensis*)⁵. No caso das aves migradoras, esta questão assume outra importância devido à grande área geográfica abrangida por estes animais. Perceber os padrões de migração, as aves que migram e as doenças zoonóticas apresentadas ou transmitidas por estes animais pode ser útil na previsão de surtos. O crescente contacto com aves selvagens noutros contextos como o cativeiro, parques zoológicos, tráfico de animais selvagens, sua utilização como animais de companhia e atividade cinegética, podem potenciar a transmissão destes agentes zoonóticos³³.

2. Caso de interesse: suspeita de Tuberculose Aviária em marrequinhas-americanas^{30, 31}

Um dos casos que mais interesse me suscitou no decorrer do estágio foi o de três marrequinhas-americanas (*Anas carolinensis*) que pertenciam ao Parque Ecológico de Gouveia, adjacente às instalações do CERVAS. O Parque Biológico possui centenas de animais de várias espécies autóctones e exóticas de mamíferos, aves e répteis, cuja sanidade se encontra ao encargo do Médico Veterinário Municipal. Mas, devido à proximidade entre o CERVAS e o parque, estes acabam por se entreatuar em várias ocasiões, como é o caso do exemplo de seguida exposto.

Gradualmente e durante um período de aproximadamente um mês, três marrequinhas-americanas começaram a exibir a seguinte **sintomatologia**: prostração e isolamento do resto do grupo, claudicação e dispneia, até que, uma por uma, acabariam por morrer. Nem todos os sinais clínicos indicados foram manifestados pelos três indivíduos, que em comum tinham a prostração e isolamento do grupo.

As instalações onde estão as marrequinhas-americanas são ao ar livre, têm pavimento em cimento e são compostas por uma jaula que delimita a área, um pequeno charco e um abrigo com palha (Figura 8). Estas instalações são partilhadas com galeirões-comuns (*Fulica atra*), galinhas-d'água (*Gallinula chloropus*) e patos-das-Bahamas (*Anas bahamensis*), já tendo sido também utilizadas por faisões (*Phasianus colchicus*). A alimentação destas aves é feita à base de alimento composto,

milho e menos frequentemente, vegetais.

Foi realizado um exame coprológico a fezes frescas colhidas do chão das instalações, e foi utilizada a técnica de *Willis* ou flutuação simples em solução saturada. Esta técnica serve para encontrar ovos leves, como os dos Ancilostomídeos. Após observação ao microscópio não foram encontradas formas parasitárias.

As **lesões patológicas** encontradas nos três indivíduos, aquando da realização das necrópsias, foram a presença de nódulos esbranquiçados na superfície e parênquima hepático, de tamanho que variava de pequenos pontos a granulomas de um centímetro de diâmetro (Figura 10) e hepatomegália. Lesões apresentadas por alguns dos indivíduos foram ascite (Figura 11), nódulos na serosa do intestino, congestão pulmonar e aerosaculite unilateral do saco aéreo clavicular direito (Figura 9). As três marrequinhas-americanas apresentavam uma condição corporal normal ou ligeiramente inferior à normal. Todos os órgãos foram embalados, etiquetados e congelados à exceção de uma porção de cada um dos três fígados que ficou fixada em formol. A presença de granulomas no parênquima hepático, apresentados pelos três indivíduos, deu origem ao **diagnóstico presuntivo de tuberculose aviária**.

A tuberculose aviária é uma doença bacteriana, crónica e contagiosa, que ocorre mundialmente e afeta praticamente todas as espécies de aves em cativeiro ou em liberdade. O agente etiológico responsável pela maioria dos casos é o *Mycobacterium avium*, e menos frequentemente, o *M. genavense*. As micobactérias são bacilos gram-positivos e intracelulares. A tuberculose aviária ocorre esporadicamente em aves selvagens e tende a afetar apenas alguns indivíduos do grupo. A sua importância em aviários e parques zoológicos tem vindo a aumentar com as crescentes ocorrências e consequências económicas.

O meio de transmissão mais frequente é o contacto direto com aves infetadas ou o contacto com água ou alimento contaminados com fezes de animais infetados, que se encontram carregadas de bacilos expelidos de lesões tuberculosas ulceradas. Esta patologia tende a desenvolver-se lentamente, podendo causar a morte dos animais infetados.

Aves infetadas manifestam sintomatologia durante semanas ou meses. Esta inclui perda de peso com ou sem anorexia, mau estado da penugem, letargia, distensão abdominal e diarreia. Pode ocorrer dispneia, claudicação unilateral ou cegueira se estiverem envolvidos os pulmões, articulações, ossos ou olhos. A baixa especificidade da sintomatologia apresentada torna difícil o diagnóstico em vida. Existem métodos auxiliares de diagnóstico que acabam por não ser

praticáveis em muitas situações, como a radiografia, laparoscopia, citologia e serologia. O teste da tuberculinização intradérmica parece ser uma resposta interessante a este problema, no entanto, mostrou-se insatisfatório em aves de rapina e aquáticas³¹.

As lesões *post mortem*, por outro lado, são mais evidentes, e as mais frequentemente encontradas são múltiplos nódulos firmes, esbranquiçados e de tamanho variável na superfície serosa do intestino ou no parênquima de outros órgãos. Estas lesões podem estar disseminadas (devido a períodos intermitentes de bacteriémia) ou concentradas num só órgão. Em aves selvagens os órgãos mais afetados são o fígado, baço e trato intestinal. Outras lesões que se podem encontrar são granulomas em articulações, hepatomegália e rutura das lesões nodulares.

A cultura em meio apropriado e posterior PCR (reação em cadeia da polimerase), a partir de amostras de fígado, baço ou medula óssea é considerado o *gold standard* na deteção de infeções micobacterianas³¹.

O cativeiro pode ser responsável por uma maior incidência de tuberculose aviária devido à maior densidade populacional e permanente utilização de um espaço potencialmente contaminado por aves infetadas. A incidência parece ser maior nas espécies em cativeiro pertencentes às ordens dos *Anseriformes* (patos, gansos, cisnes), à qual pertencem as marrequinhas-americanas, *Gruiformes* (grous, abetardas) e *Galliformes* (galinhas, perus, faisões).

O sucesso do tratamento da tuberculose depende da deteção da infeção antes desta se tornar sistémica. Mas num caso como o apresentado isso não é viável, já que o tratamento tem duração mínima de 18 meses, um custo elevado e implica a exposição continuada de humanos e outras aves a um agente bastante contagioso. O controlo da tuberculose em aves de cativeiro passa pelo sacrifício dos animais infetados e portadores do agente, descontaminação das instalações (dificultada pela capacidade de sobrevivência do *M. avium* no solo, que pode alcançar os 4 anos), drenar e descontaminar lagos e charcos após exposição a animais infetados, desinfeção de todos os materiais utilizados já que facilmente se tornam fómites, testes rotineiros e quarentena de novos animais. A utilização de vacinas em aves selvagens para o controlo da tuberculose tem uma eficácia desconhecida mas provou ser ineficaz em diversas espécies de aves aquáticas³¹.

A tuberculose aviária, ao contrário da tuberculose bovina causada pelo *Mycobacterium bovis*, não é uma doença de declaração obrigatória em Portugal e a nível internacional⁴⁰. Mesmo assim, o *M. avium* é um problema de saúde pública já que é uma zoonose com potencial de transmissão a pessoas imunodeprimidas. Existindo essa suspeita, foi contactada a Direção Geral de Alimentação

e Veterinária, DGAV. As amostras colhidas e cadáveres foram armazenados para o caso de mais tarde virem a ser recolhidos por agentes da DGAV e analisados.

3. Estudo de suscetibilidades antimicrobianas em isolados de *Escherichia coli* e *Enterococcus*, provenientes de zaragatoas cloacais de aves selvagens

3.1. Breve história dos antibióticos e da emergência das resistências antimicrobianas

Os antibióticos, bem como os seus mecanismos de ação e de resistência, têm sido amplamente estudados pela comunidade científica. Por se tratarem de substâncias e mecanismos bioquímicos naturais, os antibióticos motivam um grande interesse e curiosidade no estudo do seu papel na evolução dos microrganismos que os produzem e, também, nos impactos bióticos que exercem sobre as comunidades microbianas que coabitam com os microrganismos protutores⁸. Os genes envolvidos na biossíntese dos antibióticos, e nas suas resistências aos agentes antimicrobianos, desenvolveram-se milhares de anos antes da sua utilização como agentes terapêuticos, reconhecendo-se que se conhece ainda muito pouco sobre a sua ação na relação entre espécies bacterianas²⁶. No entanto, o panorama atual de desenvolvimento e transmissão de resistências não é natural, mas sim provocado por uma seleção artificial que temos vindo a exercer sobre as bactérias⁸.

Evidências do controlo de doenças infecciosas pelo homem remontam aos tempos do antigo Egito, Grécia e China²⁶. Na Medicina Tradicional Chinesa foi utilizada durante milhares de anos como remédio para várias doenças a artemisinina, com origem nas plantas do género *Artemisia*, antes da sua descoberta como uma potente droga no combate à malária²⁶. Foram também encontrados resíduos de tetraciclina em ossos humanos na Núbia antiga que datam dos anos 350 a 500 e em esqueletos encontrados no Egito, que datam do período Romano. A presença deste agente nos ossos é explicada pela introdução de tetraciclina na dieta dessas populações⁴.

Foram contributos como os do cientista francês Louis Pasteur (refutação da teoria da geração espontânea, pasteurização), de *Paul Ehrlich* (médico alemão que em 1910 descobriu um derivado do arsénico capaz de tratar a sífilis), do médico alemão *Robert Koch* que em 1876 provou que as bactérias podem ser agentes causadores de doença (descoberta do *Bacillus anthracis* como agente responsável pelo antraz) e do médico e bacteriologista escocês *Alexander Fleming*, com a descoberta “acidental” da penicilina, em 1928, que vieram revolucionar o tratamento de doenças

infeciosas e a medicina³². O termo “antibiótico” foi utilizado pela primeira vez pelo microbiologista naturalizado americano *Selman Waksman* e seus colegas, que descobriram a estreptomicina, para descrever uma substância química produzida por microrganismos que tem um efeito antagonista no crescimento de outros microrganismos²⁶. Mais tarde, este conceito passou a incluir as substâncias sintéticas com a mesma atividade⁸.

Os antibióticos foram introduzidos na prática clínica em meados de século passado e foi entre as décadas de 1950 e 1980 que se descobriram a quase totalidade das classes de antibióticos conhecidas atualmente^{4,34}. Esta vaga de descobertas de novos antibióticos, as novas gerações de fármacos semissintéticos e o número incontável de vidas salvas, criaram a ilusão de que tínhamos encontrado a “bala mágica” procurada por *Ehrlich*. Mas o surgimento dos primeiros sinais de resistência a antibióticos nos anos 50, com a resistência à penicilina, e em 1962 com o *Staphylococcus aureus* resistente à metilcilina (MRSA), veio revelar as limitações destes agentes³⁴. Desde então, vários estudos vieram demonstrar as múltiplas valências de certas drogas antibacterianas que atuam com sucesso em terapias antivirais, anticancerígenas e imunossupressoras⁹.

Os antibióticos interferem com a fisiologia e bioquímica das bactérias, provocando a sua morte (atividades bactericida) ou impedindo a sua multiplicação (atividade bacteriostática). Os alvos da sua ação podem ser a membrana plasmática ou parede celular, como acontece com os beta-lactâmicos e glicopeptídeos. Outros interagem com as subunidades ribossomais inibindo a síntese de proteínas (e.g. macrólidos, tetraciclina, aminoglicosídeos, cloranfenicol), interferem na síntese de ácidos nucleicos (fluoroquinolonas) ou na síntese de metabolitos essenciais (sulfonamidas)^{14,21,26}.

Desde a sua descoberta, já foram produzidas milhões de toneladas de antibióticos. O aperfeiçoamento das técnicas de produção tornaram possível o fabrico destes compostos a um custo muito baixo⁸, tornando comum a sua utilização na medicina, agricultura, pecuária, aquacultura e mesmo em alguns processos industriais. O uso massivo e imprudente destes agentes desde os anos 40 do século anterior, tem vindo a exercer uma pressão seletiva intensa e diferencial, em virtude de causar a morte das bactérias que lhes são sensíveis e a consequente colonização por bactérias naturalmente resistentes ou que desenvolveram ou adquiriram mecanismos de resistência. Este cenário ocorre tanto na flora microbiana do indivíduo ao qual foi aplicado o fármaco como no meio ambiente, sendo o último constantemente inundado com resíduos domésticos e industriais contaminados com vários agentes antimicrobianos^{8,16}. A

presença de vários princípios ativos a exercer pressão seletiva sobre as bactérias dá origem a formas multirresistentes, designados também de *superbugs*, responsáveis por elevadas taxas de morbilidade e mortalidade. Por mais intimidante que pareça, existe uma agravante no potencial desfecho desta situação, em virtude do mecanismo de transmissão de informação genética entre bactérias permitir que sejam transferidos genes de resistência entre diferentes géneros de bactérias² e entre bactérias que não estiveram em contacto direto com o agente²⁶.

A crescente descoberta de mecanismos de resistência, como a inativação enzimática (exemplo das β -lactamases), bombas de efluxo membranares, alteração da permeabilidade da membrana externa, modificações nos alvos moleculares dos antibióticos, mutação cromossomal, entre outros, pode ser desencadeado por diversos fatores, entre os quais, a exposição a concentrações sub-inibitórias de um determinado antibiótico. Também a transmissão horizontal de alguns genes de resistência parece ser potenciada pela exposição a baixas concentrações de antibióticos²⁶.

A presença e persistência de estirpes bacterianas resistentes a antimicrobianos nos solos, esgotos e em diferentes corpos de água, incluindo águas usadas no abastecimento da população, são uma crescente preocupação para os especialistas em saúde pública²³.

Comportamentos de risco, como o uso de antibióticos como promotores de crescimento na pecuária e aquacultura, aplicação de regimes terapêuticos inadequados na duração, dose administrada ou seleção do princípio ativo e utilização de antibióticos em produtos de higiene e limpeza têm de ser substituídos por práticas mais sustentáveis³⁶. Exemplo de medidas que podemos adotar para atenuar a ameaça das resistências para a saúde humana, animal e dos ecossistemas, passam por criar normas e restrições para a utilização destas substâncias, otimizar técnicas de diagnóstico e regimes terapêuticos de forma a reduzir o uso de antibióticos ao mínimo necessário, não tratar infeções assintomáticas nem infeções não bacterianas, apostar na prevenção da transmissão de infeções através de protocolos vacinais, higiene e isolamento de pacientes infetados e no desenvolvimento de novas terapias^{22,35}. No caso específico dos médicos veterinários, estes devem esforçar-se por fazer um uso ponderado dos antibióticos e manter a saúde animal através da prevenção, com melhores condições de higiene e bem-estar³⁷.

A execução de estudos de prevalência de resistências antimicrobianas em humanos, em animais, em águas (e.g. de abastecimento ou residuais) e nos solos é essencial para a monitorização da emergência e transmissão de resistências. Os animais selvagens são importantes objetos de estudo pois são reservatórios de bactérias resistentes e, como não estão expostos a agentes antimicrobianos diretamente, todas as resistências adquiridas pelas bactérias que colonizam o seu

organismo tiveram, naturalmente, origem no contacto com o meio ambiente, no ser humano ou noutros animais²⁰. A proximidade à atividade humana influencia os perfis de resistência apresentados pelas bactérias gastrointestinais de animais e a transmissão de bactérias resistentes do homem aos animais selvagens ocorre maioritariamente pelo contacto com água ou alimentos contaminados²⁰. Os animais selvagens, e em particular as aves por terem grande facilidade em se deslocar entre habitats, têm um importante papel na dispersão de agentes patológicos e de genes de resistência entre os diferentes ambientes.

A crise das resistências antimicrobianas é o culminar de décadas de práticas incorretas potenciadas pela globalização, responsável pelo grande movimento de produtos agrícolas, animais e pessoas, mas que também facilita a disseminação de genes de resistência²⁴. Este é um problema complexo com sérias consequências que exige a todos os intervenientes (microbiologistas, especialistas em saúde pública, indústria farmacêutica, médicos, veterinários, ecologistas, órgãos legislativos, agricultores e restante população) que caminhem em direção ao mesmo objetivo (preservar a eficácia dos agentes antimicrobianos) num esforço conjunto global, já que as más práticas de uns põem em causa o sucesso de toda a missão.

3.2. Espécies bacterianas estudadas: *Escherichia coli* e *Enterococcus*

Provavelmente a espécie bacteriana mais conhecida e estudada, a ***Escherichia coli*** é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo e o mais comum habitante do trato gastrointestinal humano e dos animais de “sangue quente”. Este coliforme fecal pertence à família Enterobacteriaceae, da qual fazem parte muitas das bactérias entéricas que têm a capacidade de fermentar a lactose. Possui fímbrias que permitem a aderência a superfícies ou mucosas e *pili* sexuais utilizados na troca de informação genética como as resistências a antibióticos³². É uma espécie com enorme plasticidade genética, capaz de transferir plasmídeos a outras espécies bacterianas¹².

Embora normalmente não cause doença em humanos saudáveis, a *E. coli* está na origem de muitas infeções nosocomiais, que se manifestam como infeções do trato urinário, pielonefrite, bacteriemia e pneumonias¹⁹. É ainda responsável por toxinfecções de origem alimentar. Indivíduos infetados com a estirpe virulenta *E. coli* O157:H7, pertencente ao único patótipo considerado zoonótico, a EHEC ou *E. coli* enterohemorrágica³⁰ produtora da toxina *Shiga*, desenvolvem uma diarreia grave e colite hemorrágica³².

Algumas estirpes de *E. coli* são capazes de sintetizar β -lactamases de espectro alargado

(conhecidas pela sigla ESBL – *Extended Spectrum Beta-Lactamases*) assim designadas por terem capacidade para inativar praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos^{2,6,26,34}. A resistência aos carbapenemos, também pertencentes à classe dos β -lactâmicos, é particularmente preocupante já que é um antibiótico tipicamente reservado para o tratamento de doenças infecciosas causadas por agentes multirresistentes, como as Enterobacteriaceae produtoras de ESBL^{10,34,39}. Estas estão frequentemente implicadas em infeções urinárias, gastrointestinais e pulmonares em pacientes hospitalizados^{2,32}.

As classes de antibióticos, às quais a espécie *E. coli* frequentemente possui resistências, incluem os β -lactâmicos, as fluoroquinolonas e os aminoglicosídeos¹⁹.

As bactérias do género ***Enterococcus*** são bactérias gram-positivas e anaeróbias facultativas, bem adaptadas a meios com pouco oxigénio e ricas em nutrientes, como o trato gastrointestinal (principalmente o intestino grosso), cavidade oral e sistemas reprodutivo e urinário. São organismos relativamente resistentes às condições ambientais e que rapidamente têm adquirido resistências a vários antibióticos^{32,34}. Existem dezenas de espécies conhecidas, reconhecendo-se que a maioria seja não virulenta, porém, determinadas estirpes de *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*, desde os anos 80 que são alvo de uma crescente preocupação, por serem responsáveis por uma grande parte das infeções nosocomiais. Estas incluem infeções de feridas cirúrgicas e do trato urinário³², endocardites, bacterémia, e infeções pélvicas e intra-abdominais^{19,34}. Os VRE, *Enterococcus* resistentes à vancomicina, são a causa de muitas destas infeções hospitalares e o seu tratamento representa um desafio em virtude das resistências adquiridas mas, sobretudo, das resistências intrínsecas destas espécies³⁴. A linezolid, a daptomicina e combinação de quinopristina e dalfopristina^{2,20,34}, são as mais frequentemente empregues no tratamento de infeções por VRE.

Já foram identificadas resistências em *Enterococcus* aos β -lactâmicos, à teicoplanina, outro glicopéptido, aminoglicosídeos, macrólidos e tetraciclina^{10,19}.

Porém, os problemas não se cingem aos hospitais, reportando-se com crescente frequência *Enterococcus* resistentes à vancomicina e *E. coli* produtoras de ESBL fora do ambiente hospitalar, em animais selvagens e de produção, bem como no ambiente em geral¹³. Estes dois agentes são considerados indicadores chave na análise da evolução das resistências microbianas no ambiente e nos animais selvagens. Dentro da classe das aves, os grupos das aves de rapina e aquáticas parecem ser os principais portadores destes dois grupos de bactérias²⁰.

Segundo o CDC, Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamases e *Enterococcus* resistentes à vancomicina são consideradas ameaças sérias, enquanto que as Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenemos estão incluídas nas ameaças urgentes, no panorama geral das resistências aos antibióticos.

3.3. Objetivo e Amostra

Este estudo tem como principal objetivo a pesquisa de resistências antimicrobianas em isolados de *E. coli* e *Enterococcus*, obtidos a partir de amostras fecais recolhidas em aves selvagens que ingressaram no CERVAS. Em simultâneo fizeram-se tentativas para isolar *Campylobacter*, mas sem sucesso.

No total colheram-se 41 amostras de 37 indivíduos (4 em duplicado, com métodos de colheita diferentes) (Tabela 1), de 17 espécies de aves, pertencentes a 7 ordens taxonómicas. As ordens mais representadas foram os *Strigiformes*, rapinas noturnas, com 43% do total das amostras, e os *Accipitriformes*, rapinas diurnas, com 35%.

3.4. Métodos e Materiais

3.4.1. Protocolo

O protocolo seguido foi baseado no esquema que se encontra na Figura 2, e que foi sofrendo alguns ajustes ao longo do tempo de forma a otimizar os procedimentos, constituindo um enriquecedor processo de aprendizagem.

3.4.2. Preparação das amostras

A recolha das amostras era inicialmente feita com zaragatoas secas estéreis, mas o facto de algumas amostras não terem permitido a recuperação de isolados para avaliação das resistências, nem de se ter conseguido isolar *Campylobacter*, foram o motivo principal para a alteração da técnica de recolha, bem como dos passos para o isolamento de bactérias anaeróbias facultativas (*E. coli* e *Enterococcus*) e microaerófilas (*Campylobacter*). As amostras passaram então a ser recolhidas com zaragatoa estéril e um meio de transporte (meio de *Stuart*) para o isolamento de *E. coli* e *Enterococcus*, e com uma zaragatoa estéril em tubo *Falcon* com 10 mL de CFB (*CampyFood Broth*, um meio líquido para crescimento microbiológico), para isolamento de *Campylobacter*.

Também houve a preocupação em encurtar o tempo entre a recolha das amostras e o início dos ensaios laboratoriais, embora este cuidado estivesse à partida muito condicionado pela oportunidade das recolhas, bem como pela distância entre o CERVAS e o ICBAS.

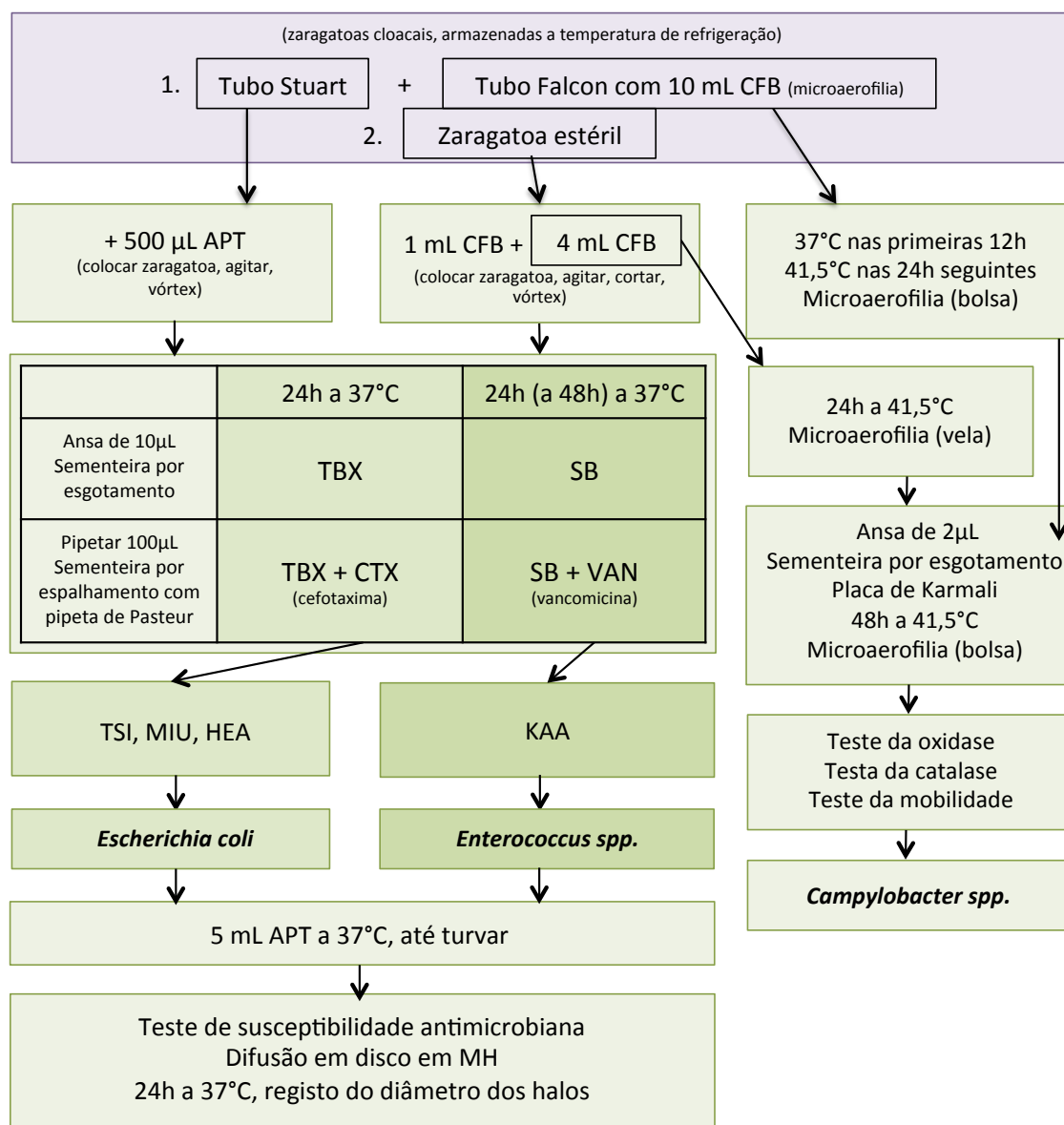


Figura 2: Protocolo seguido no isolamento de *E coli* e *Enterococcus spp.*, para a realização de testes de sensibilidade e na tentativa de isolamento de *Campylobacter spp.*. Com fundo violeta está descrito o procedimento de colheita das amostras, que foi executada no CERVAS. A fundo verde está o processamento laboratorial realizado no Laboratório de Microbiologia do ICBAS.

No laboratório, o material contido nas zaragatoas secas era transferido para tubos com CFB e, a partir deste meio líquido, eram semeadas as placas com agar TBX e SB, com e sem antibióticos incorporados. O enriquecimento destes meios com cefotaxima e vancomicina visava aumentar a

sensibilidade na detecção de fenótipos mais resistentes (Figura 2). O restante material presente no tubo era incubado a 41,5°C em condições de microaerofilia para enriquecimento das (eventuais) células de *Campylobacter*.

O tratamento de amostras colhidas com tubos Stuart e tubos *Falcon* com CFB foi diferente. Os tubos *Falcon* com CFB para isolamento de *Campylobacter* foram colocados num recipiente em condições de microaerofilia logo após a colheita das amostras, e foram assim mantidos até serem processados no laboratório (incubação a 41,5°C, transferência para placas com meio apropriado e nova incubação a 41,5°C, de acordo com o protocolo). O material nas zaragatoas nos tubos Stuart foi transferido para 0,5 mL de APT (Água Peptonada Tamponada) para revitalização, i.e. para recuperação de bactérias com lesões sub-letais, que por sua vez foram utilizados para inocular placas de TBX e SB.

3.4.3. Meios de cultura utilizados ¹

Meios utilizados no isolamento de *E. coli*:

- O agar TBX (*Tryptone Bile X-glucuronide*) é um meio seletivo utilizado no isolamento de *Escherichia coli*. A presença de sais biliares inibe o crescimento de grande parte das bactérias gram-positivas. As colónias de *E. coli* apresentam nesta gelose uma coloração que varia entre o azul e o verde, causada pela presença no meio de um substrato cromogénico, o 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronídeo, que é hidrolisado pela β -glucuronidase produzida por estas bactérias (Figura 12a). Por cada amostra foi também inoculada uma placa com agar TBX enriquecido com cefotaxima, uma cefalosporina de terceira geração, para recuperação seletiva de estirpes produtoras de β -lactamases de espectro alargado.
- Colónias que possuíam características duvidosas (e.g. uma coloração azul muito ténue) eram transferidas para agar TSI (*Triple Sugar Iron*) e teste MIU, que avalia numa só inoculação a Mobilidade, a produção de indol, e a atividade da urease. Um resultado em meio TSI é considerado positivo para *E. coli* quando o meio adota a cor amarela em toda a sua extensão (sinal de que houve fermentação da lactose ou sacarose) e quando se observa presença de gás sob a forma de ar aprisionado entre o gel e o vidro do tubo (Figura 13). Um resultado do teste MIU é considerado compatível para *E. coli* quando se observa crescimento bacteriano divergente da linha de inoculação (mobilidade positiva), a ausência da enzima urease (a ureia contida no meio em contacto com a urease produzida pelas bactérias é hidrolisada e dá origem a dióxido de carbono, amónia e água, que, em

conjunto, elevam o valor de pH do meio, provocando a alteração da sua cor para cor-de-rosa, no caso da *E. coli* o meio mantém-se ligeiramente amarelo) e a produção de indol, que só deve ser testada depois de lidos os resultados da mobilidade e da urease (o indol é formado na hidrólise do aminoácido triptofano por uma enzima produzida pela *E. coli*, e a sua presença é testada com a adição de algumas gotas do agente de Kovacs que reage com o indol e produz um composto de cor carmim) (Figura 14).

- A abordagem em placas de TBX muito contaminadas passa por repicar a colónia a estudar, e fazer uma sementeira por esgotamento de numa placa com agar HEA (*Hektoen Enteric Agar*). As colónias de *E. coli*, ao fermentar a lactose presente no meio, alteram a cor deste, que fica cor-de-laranja (Figuras 12b e 12c).

Meios utilizados no isolamento de *Enterococcus*:

- O meio de agar SB (*Slanetz e Bartley*) foi usado por ser altamente seletivo para bactérias do género *Enterococcus*, onde estas colónias apresentam cores que variam entre o rosa-velho e o carmim (Figura 15a e 15b). Em simultâneo foi inoculada uma placa com agar SB enriquecido com vancomicina, para a pesquisa de *Enterococcus* resistentes à mesma.
- As colónias que cresceram nas placas de SB são transferidas para placas com agar KAA (*Kanamycin Aesculin Azide*) e incubadas durante 24h a 37°C. As bactérias do género *Enterococcus* hidrolisam a esculina presente no meio dando origem a halos castanhos em redor das colónias (Figura 15c).

3.4.4. Teste de suscetibilidade antimicrobiana

Para a realização dos testes de suscetibilidade antimicrobiana foi utilizada a técnica de difusão em disco de acordo com os procedimentos definidos pelo EUCAST¹¹. As colónias de *E. coli* e *Enterococcus* isoladas foram enriquecidas com APT e incubadas a 37°C durante 18 a 24h. O crescimento bacteriano é aferido através de uma escala (*McFarland*) para uniformização do inóculo através do grau de turvação da cultura em meio líquido.

A partir destas suspensões é realizada a sementeira de placas com meio *Mueller-Hinton* (MH), onde são colocados os discos impregnados com os antibióticos testados: 19 no caso da *E. coli* e 16 em *Enterococcus*. Estas placas são incubadas a 37°C e após 24h são registados os diâmetros das áreas de inibição do crescimento de cada antibiótico (Figura 16). Os resultados são expressos numa escala qualitativa com três categorias: resistente (R), intermédio (I) ou sensível (S).

Os antibióticos testados encontram-se discriminados na Tabela 2, nos Anexos, bem como os seus

mecanismos e espectro de ação, e a percentagem de isolados de *E. coli* e de *Enterococcus* resistentes a cada um deles.

A identificação de estirpes de *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado é realizada através de um teste fenotípico, baseado na sensibilidade destas estirpes ao ácido clavulânico, mediante a observação dos halos de inibição entre os discos de amoxicilina com ácido clavulânico, ceftazidima e cefotaxima. Se for observado uma ampliação e deformação destes halos, como demonstrada na Figura 17, estamos perante uma *E. coli* ESBL.

3.5. Resultados e Discussão

Os resultados encontram-se apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, nos Anexos, e para a interpretação destes, os resultados classificados como “intermédios” foram considerados como “sensíveis”.

Das 37 aves amostradas, conseguiu-se isolar *Enterococcus* em 25 delas (70%) e *E. coli* em 18 (48%). O baixo número de isolados, em particular de *E. coli*, pode ter sido devido, em algumas situações, ao elevado número de dias decorridos entre a colheita da amostra e o seu processamento e, também, à utilização de zaragatoas secas nas primeiras amostras colhidas, já que não proporcionam as condições ideais para a sobrevivência das bactérias. Noutros casos, as bactérias isoladas em TBX e SB não cresceram nas placas de MH, utilizadas no antibiograma. Isto pode ter sido causado pela realização da sementeira em placas de MH com inóculo insuficiente (APT pouco turvo).

Comparando os dois métodos utilizados na recolha de amostras para isolamento de *E. coli* e *Enterococcus*, as zaragatoas estéreis secas e zaragatoas estéreis em tubos *Stuart*, foi com este último que se conseguiram um maior número de colónias nas placas de TBX e SB e de isolados de *E. coli*.

Dos 20 isolados de *E. coli*, pertencentes a 18 espécimes diferentes, 45% mostraram-se sensíveis a todos os 19 antibióticos testados (41,4% no relatório de vigilância de resistências antimicrobianas na Europa em 2016¹⁰), 20% apresentaram resistência a 1 ou 2 antibióticos e 35% eram simultaneamente resistentes a 4 a 13 antibióticos. No geral, 40% dos isolados manifestaram resistência a antibióticos pertencentes a pelo menos duas classes. As resistências mais frequentemente encontradas foram à ampicilina (50% dos isolados), à estreptomicina (35%), à

tetraciclina (30%), à combinação de trimetoprim com sulfametoxazol (30%) e à ciprofloxacina (25%). Merece também referência o facto de 20% dos isolados apresentaram resistência ao cloranfenicol e 15% mostraram-se resistentes à ação de várias cefalosporinas (Cefazolina, Ceftazidima e Cefotaxima) (Tabela 2). Os antibióticos aos quais não foram registadas resistências foram: amoxicilina com ácido clavulânico, imipenem, cefoxitina, amicacina e nitrofurantoína.

Analisando as resistências de maior interesse, exibidas pela *E. coli*:

- não foram encontradas resistências ao carbapenemo testado, o imipenem;
- foram isoladas três *E. coli* produtoras de ESBL (15% do total de isolados), duas das quais com resistências contra β -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos e uma com resistências contra β -lactâmicos e aminoglicosídeos;
- 50% dos isolados manifestaram resistência a aminopenicilinas (ampicilina). Com a devida prudência, é possível reconhecer que este valor não difere muito do repostado no Relatório de Vigilância de Resistências Antimicrobianas na Europa, de 2016, elaborado pelo ECDC¹⁰, que indica que 59,2% e 57,4% dos isolados invasivos de *E. coli* são resistentes a esta classe de antibióticos, em Portugal e na Europa respetivamente;
- 40% apresentaram resistências a aminoglicosídeos (um valor bastante superior aos 13,1% registados em Portugal, e 9,8% na Europa¹⁰), sendo que 62,5% destes manifestaram resistência apenas à estreptomicina, 12,5% à gentamicina e tobramicina e 25% à gentamicina, tobramicina e estreptomicina. Todos os isolados se mostraram sensíveis à amicacina;
- 25% dos isolados apresentaram resistência às fluoroquinolonas, sendo esta frequência semelhante aos valores reportados para Portugal: 28,9%, e para a Europa: 21%¹⁰;
- 15% dos isolados apresentaram resistência a cefalosporinas de terceira geração (16,1% em Portugal e 12,4% na Europa¹⁰).

As estirpes de *E. coli* ESBL foram isoladas em amostras colhidas de um grifo adulto (*Gyps fulvus*), de uma cria de coruja-do-mato (*Strix aluco*) e de uma cria de melro-preto (*Turdus merula*). Tanto as corujas-do-mato como os melros-pretos partilham os seus habitats com o homem, já que podem ser encontrados em parques e jardins de cidades e aldeias. Os grifos habitam zonas montanhosas mais longe da população, no entanto, os seus hábitos necrófagos, a sua elevada posição na cadeia trófica e o facto de se poderem alimentar de cadáveres de explorações pecuárias, podem ter resultado na aquisição de genes de resistência responsáveis pela produção de ESBL, pelas bactérias pertencentes à microflora comensal intestinal destes animais.

Dos 30 isolados de *Enterococcus*, 30% mostraram-se sensíveis aos 16 antibióticos em estudo, 40% dos isolados apresentaram resistência a 1 ou 2 antibióticos, 17% apresentaram a 3 ou 4 antibióticos, e 13% a 6 ou 7. De maneira semelhante aos isolados de *E. coli*, 43% dos isolados de *Enterococcus* mostraram-se resistentes à ação de antibióticos de pelo menos 2 classes de antibióticos. As resistências mais frequentes dirigiram-se à tetraciclina (em 50% dos isolados), quinopristina e dalfopristina (37%), rifampicina (23%) e eritromicina (23%) (Tabela 2). Os agentes testados aos quais todos os isolados de *Enterococcus* foram sensíveis foram a vancomicina, a teicoplanina, a fosfomicina, a linezolida e a nitrofurantoína.

Analisando as resistências de maior interesse, manifestadas por *Enterococcus*:

- apenas foram registradas resistências às penicilinas testadas (ampicilina e penicilina G) em 2 isolados, ambos provenientes do mesmo indivíduo;
- 37% dos isolados apresentaram resistência à associação da quinopristina e dalfoprintina;
- 23% dos isolados manifestaram resistência ao único macrólidos testado, a eritromicina;
- 7% de isolados resistentes ao aminoglicosídeo testado, a gentamicina;
- mesmo com o recurso a meios seletivos, não foram encontrados enterococos resistentes à vancomicina.

Foram identificados 10 fenótipos de resistência diferentes em isolados de *E. coli*, sendo que o único que se repetiu foi a resistência à ampicilina (indicado como Fc3 na Tabela 3). Em *Enterococcus*, foram identificados 12 fenótipos de resistência (Tabela 4). Os mais frequentes foram o representado como Fe1, resistência aos macrólidos, tetraciclina, fluoroquinolonas e à combinação de quinopristina com dalfopristina (24% do total de isolados), e o Fe3, que representa a resistência à rifampicina (19%).

Embora o número de indivíduos testados seja baixo, podemos fazer uma pequena comparação entre as ordens taxonômicas mais representadas: a ordem dos *Accipitriformes* (aves de rapina diurnas, inclui famílias *Accipitridae*, *Pandionidae* e *Falconidae*) e a ordem dos *Strigiformes* (rapinas noturnas, inclui as famílias *Strigidae* e *Tytonidae*). Dos animais pertencentes à ordem *Accipitriformes*, 50% dos isolados de *E. coli* demonstraram-se sensíveis a todos os antibióticos testados, 12,5% apresentaram resistência a um antibiótico e 37,5%, a 6 e 8 antibióticos. Os antibióticos aos quais não foram identificadas resistências foram a nitrofurantoína, imipenem, cefoxitina, amicacina e amoxicilina com ácido clavulânico. A ampicilina e a estreptomicina foram os antimicrobianos com menos eficácia na inibição da *E. coli*, nas amostras desta ordem. De igual

maneira, 50% das *E. coli* isoladas nas rapinas noturnas mostraram-se sensíveis à ação de todos os antibióticos testados: 25% dos isolados apresentaram resistência a apenas um antibiótico e os restantes 25% manifestaram-se resistentes a entre 6 e 13 antibióticos. Os antibióticos aos quais não foram identificadas resistências foram os mesmos do caso dos *Accipitriformes*, mais a doxiciclina. O agente com o menor poder de inibição foi a ampicilina. Quanto aos isolados de *Enterococcus*, nos *Accipitriformes*, 25% foram sensíveis a todos os antibióticos, 8% foram inibidos por apenas um antibiótico e 67% apresentaram resistências a entre 2 e 6 antibióticos. Dos 7 antibióticos eficazes na inibição do crescimento de todos os *Enterococcus* isolados, os mais relevantes são as penicilinas, a vancomicina, teicoplanina e linezolida. Acresce mencionar que 58% dos isolados mostraram-se resistentes à ação da tetraciclina e da combinação de quinopristina e dalfopristina. Em *Strigiformes*, 35% dos isolados de *Enterococcus* foram sensíveis a todos os antibióticos, 22% manifestaram resistência a apenas um e 55% apresenta resistência a entre 2 e 6 dos antibióticos testados. Entre os 7 antibióticos com melhor atividade sobre estes isolados, os mais relevantes são a vancomicina, teicoplanina e linezolida. A tetraciclina foi o agente microbiano ao qual menos isolados de *Enterococcus* se mostraram sensíveis.

Os diferentes habitats e hábitos alimentares das espécies amostradas estão enumerados na Tabela 1, nos Anexos. Certos comportamentos como o das cegonhas-brancas (*Ciconia ciconia*) e os milhafres-pretos (*Milvus migrans*), que costumam frequentar locais como aterros sanitários, podem ser importantes na interpretação dos resultados, já que foi demonstrado que o aparecimento de bactérias resistentes em animais selvagens está relacionado com o grau de associação às atividades humanas²⁷. Exemplo de gaivotas que possuem as mesmas estirpes bacterianas que as isoladas em estações de tratamento de água e lixeiras^{3,18}. Enquanto permanecem no CERVAS, os animais carnívoros são alimentados com carne de coelho e com ratos criados no biotério, enquanto que outros animais, como o caso dos andorinhões, melros-pretos e rola-turca amostrados, são alimentados com larvas de tenébrios, ração para turdídeos e/ou sementes, dependendo dos seus hábitos alimentares. Neste contexto, é legítimo questionar se tempo de permanência no CERVAS, onde estão em instalações que já receberam milhares de outros animais e estão expostos a uma alimentação criada e fornecida pelo homem, se vai traduzir em diferenças nas resistências apresentadas pelas bactérias que habitam os seus aparelhos digestivos. Infelizmente, o baixo número de amostras e o facto de não terem sido encontradas diferenças significativas entre os animais cujas amostras foram colhidas no dia do ingresso e animais com estadias superiores a 150 dias (milhafres), não permite responder a esta pergunta.

As amostras onde foi identificado um maior número de resistências pertencem às espécies

milhafre-preto (*Milvus migrans*), coruja-do-mato (*Strix aluco*), melro-preto (*Turdus merula*), gralha-preta (*Corvus corone*) e gavião (*Accipiter nisus*). Todas estas espécies partilham os seus habitats com o ser humano e podem ser encontradas em parques ou jardins em cidades e aldeias. A maioria dos milhafres amostrados tiveram ainda como causa de ingresso o cativeiro ilegal.

3.6. Conclusão

O reduzido número de indivíduos amostrados e, consequentemente, o baixo número de isolados conseguidos neste breve estudo, não permitem o levantamento de conclusões quanto à relação entre fenologia, tipo de alimentação e origem das aves e a manifestação de resistências antimicrobianas. Não tendo sido esse o objetivo inicial, seria interessante aprofundar estas questões em trabalhos futuros. Os resultados obtidos servem, no entanto para expor a presença de estirpes bacterianas multirresistentes em animais que nunca estiveram em contacto direto com antibióticos, e para salientar a importância do estudo das espécies animais selvagens na monitorização da dispersão de resistências antibacterianas.

É de salientar, no entanto, o elevado número de isolados bacterianos com resistência a múltiplos antibióticos. A presença destas estirpes bacterianas multirresistentes em aves selvagens é problemático, já que estas habitam todo o tipo de ambientes e em grande proximidade com o homem. No caso das aves migradoras, esta questão torna-se mais relevante pela possibilidade de aquisição e disseminação através de uma extensa área geográfica.

Os antibióticos com maior taxa de resistência foram a ampicilina, no caso da *E. coli*, e a tetraciclina no caso do género *Enterococcus*, ambos com 50%. A nitrofurantoína foi o único dos 7 antibióticos testados nos dois grupos de isolados relativamente ao qual, tanto *E. coli* como *Enterococcus*, se mostraram sensíveis.

Foram ainda identificadas estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL em 15% dos isolados, algumas das quais provenientes de amostras de crias de coruja-do-mato e de melro-preto, de apenas algumas semanas de vida. Não foi isolado nenhum enterococos resistente à vancomicina ou *E. coli* resistente a carbapenemos.

A realização de cada vez mais estudos de suscetibilidade antimicrobiana em animais selvagens por todo o mundo, assume um papel fundamental no controlo da presente crise que temos vindo a experienciar, já que permite a comparação de perfis de resistência e a monitorização da dispersão

dos genes responsáveis. Para além da pesquisa de resistências em animais ingressados, seria interessante tentar perceber o papel que os centros de recuperação, como o CERVAS, podem ter na transmissão de genes de resistência entre animais ou entre humanos e animais.

As atividades humanas têm um impacto inegável na emergência de crises de saúde pública, como as resistências antimicrobianas. Da mesma maneira, a correção de más práticas tem o potencial de atenuar e até de reverter os efeitos desta crise. Os médicos veterinários, enquanto importantes agentes na proteção da saúde pública, têm grandes responsabilidades que devem ser assumidas. Uma dessas responsabilidades é, obrigatoriamente, o combate ao uso excessivo e inadequado de agentes antibióticos na pecuária e aquacultura, já que é uma atitude que não só está na origem, como perpetua a situação atual. Para travar a emergência e transmissão das resistências antimicrobianas, numa perspetiva *Uma Saúde*, é necessário que todos os profissionais envolvidos atuem em conformidade com a gravidade da situação, e que tenham a consciência de que atravessamos uma crise que pode fazer regressar taxas de mortalidade e morbilidade por causas infecciosas, semelhantes às da era pré-antibióticos.

Bibliografia

1. Atlas RM (2010) **Handbook of microbiological media** 4ª Edição, CRC Press
2. Alekshun MN, Levy SB (2007) “Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance” in **Cell** 128, 1037–1050
3. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J (2010) “Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments” in **Nature Reviews Microbiology** 8, 251–259
4. Aminov RI (2010) “A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future” in **Frontiers in Microbiology** 1, 134
5. Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, Morner T, Tate CM (2004) “The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses” in **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties** 23, 497–511
6. Bush K, Fisher JF (2011) “Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria” in **Annual Review of Microbiology** 65, 455–478
7. Correia C, Costa E, Peres A, Alves M, Pombo G, Estevinho L (2007) “Etiologia das infeções do tracto urinário e a sua susceptibilidade aos antimicrobianos” in **Acta Médica Portuguesa** 20, 543–549
8. Davies J, Davies D (2010) “Origins and Evolution of Antibiotic Resistance” in **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 74, 417–433
9. Demain, AL, Sanchez S (2009) “Microbial drug discovery: 80 years of progress” in **The Journal of Antibiotics** 62, 5–16.
10. European Centre for Disease Prevention and Control (2017) “Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)”, 7–17, 55–58
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2017) “Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method” Versão 6.0
12. Gastalho S, da Silva GJ, Ramos F (2014) “Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública” in **Acta Farmacêutica Portuguesa** 3, 29–45
13. Guenther S, Ewers C, Wieler LH (2011) “Extended-spectrum beta- lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution?” in **Frontiers in Microbiology** 2, 246
14. Maddison JE, Page SW, Church DB (2010) “Antibacterial drugs” in **Small Animal Clinical Pharmacology** 2ª Edição, Elsevier, 148–185
15. Martel JL, Tardy F, Sanders P, Boisseau J (2001) “New trends in regulatory rules and surveillance of antimicrobial resistance in bacteria of animal origin” in **Veterinary Research** 32, 381–392
16. Martinez JL (2009) “The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria” in **Proceedings. Biological Sciences** 276, 2521–2530
17. Narciso A, Fonseca F, Cerqueira S, Duarte A (2011) “Susceptibilidade aos antibióticos de bactérias responsáveis por cistites não complicadas: estudo comparativo dos isolados de 2008 e 2010” in **Acta Urológica Portuguesa** 1, 16–21

18. Nelson M, Jones SH, Edwards C, Ellis JC (2008) "Characterization of *Escherichia coli* populations from gulls, landfill trash, and wastewater using ribotyping" in **Diseases of Aquatic Organisms** 81, 53–63
19. Neu HC (1992) "The Crisis in Antibiotic Resistance" in **Science** 257, 1064–1073
20. Radhouani H, Silva N, Poeta P, Torres C, Correia S, Igrejas G (2014) "Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health" in **Frontiers in Microbiology** 5, 23
21. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RL, Henderson G (2012) "Basic Principles of Antimicrobial Chemotherapy" e "Antibacterial Drugs" in **Rang and Dale's Pharmacology**, 7ª Edição, Elsevier, 609–637
22. Read AF, Woods RJ (2014) "Antibiotic resistance management" in **Evolution, Medicine and Public Health** 2014, 147
23. Reinthaler FF, Posch J, Feierl G, Wust G, Haas D, Ruckebauer G, Mascher F, Marth E (2003) "Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge" in **Water Research** 37, 1685–1690
24. Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, Hay SI, Jiwakanon J, Kakkar M, Kariuki S, Laxminarayan R, Lubroth J, Magnusson U, Thi Ngoc P, Van Boeckel, Woolhouse MEJ (2016) "Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue" in **The Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene** 110, 377–380
25. Relatório de Atividades do CERVAS de 2017 disponível em: <http://cervasaldeia.blogspot.com/2018/01/relatorio-de-atividades-2017.html>
26. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP (2013) "The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature" in **Frontiers in Microbiology** 4, 47
27. Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amorin C, Rouquet P, Picard B, Denamur E (2006) "Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*" in **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 57, 1215–1219
28. Sleeman JM, DeLiberto T, Nguyen N (2017) "Optimization of human, animal, and environmental health by using the One Health approach" in **Journal of Veterinary Science** 18, 263–268
29. Svensson L (2017) **Guia de aves – o guia de campo mais completo das aves de Portugal e da Europa** 3ª Edição, Assírio & Alvim
30. Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V (2013) "Tuberculosis" in **Diseases of Poultry** 13ª Edição, Wiley-Blackwell, 1008–1017
31. Thomas NJ, Hunter DB, Atkinson CT (2007) "Avian Tuberculosis" in **Infectious Diseases of Wild Birds** 1ª Edição, Blackwell, 289–299
32. Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2012) "Procariotas: Domínios *Bacteria* e *Archaea*" , "Drogas antimicrobianas" e "Doenças microbianas do Sistema Digestório" in **Microbiologia** 10ª Edição, Artmed, 306–320, 554–579, 711–718
33. Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Falagas ME (2008) "Human infections associated with wild birds" in **Journal of Infection** 56, 83–98
34. Ventola CL (2015) "The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats" in **Pharmacy and Therapeutics** 40, 277–283
35. Ventola CL (2015) "The Antibiotic Resistance Crisis Part 2: Management Strategies and New agents" in

Pharmacy and Therapeutics 40, 344–352

36. World Health Organization (2012) “Chapter 4. Reducing the use of antibiotics in animal husbandry” in **The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action**, 50–61

37. World Health Organization (2016) “The OIE Strategy on Antimicrobial Resistance and the Prudent Use of Antimicrobials”

38. Blog do CERVAS (<http://cervas-aldeia.blogspot.com/p/sobre-o-cervas.html>)

39. CDC: One Health: <https://www.cdc.gov/onehealth/index.html>, Resistências antimicrobianas: <https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>)

40. Listas das doenças de declaração obrigatória a nível nacional, a nível comunitário (EU) e a nível internacional (OIE), disponíveis em: <https://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=23555&generico=19316&cboui=19316>

41. OIE: One Health: <http://www.oie.int/en/for-the-media/editorials/detail/article/one-health/>

42. OMS: Resistências antimicrobianas: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>, One Health: <http://www.who.int/features/qa/one-health/en/>

Anexos

Fotografias originais.



Figura 3: Alimentação à mão de um melro-preto (esquerda) e de um bufo-real (direita).



Figura 4: Registo das biometrias num andorinhão, antes de realizar a necrópsia.

Figura 5: Realização de necropsia a um peto-real (esquerda), um texugo (centro) e um grifo (direita).





Figura 6: Participação em várias ações de educação e sensibilização ambiental, e em devoluções à natureza de animais recuperados.



Figura 7: Material biológico preparado, recolhido durante as necrópsias e utilizado para exposição e em ações de educação ambiental.



Figura 8: Instalações das marrequinhas-americanas no Parque Ecológico de Gouveia.



Figura 9: Aerossaculite unilateral no saco aéreo clavicular direito (seta branca) e saco aéreo clavicular esquerdo normal (seta amarela).

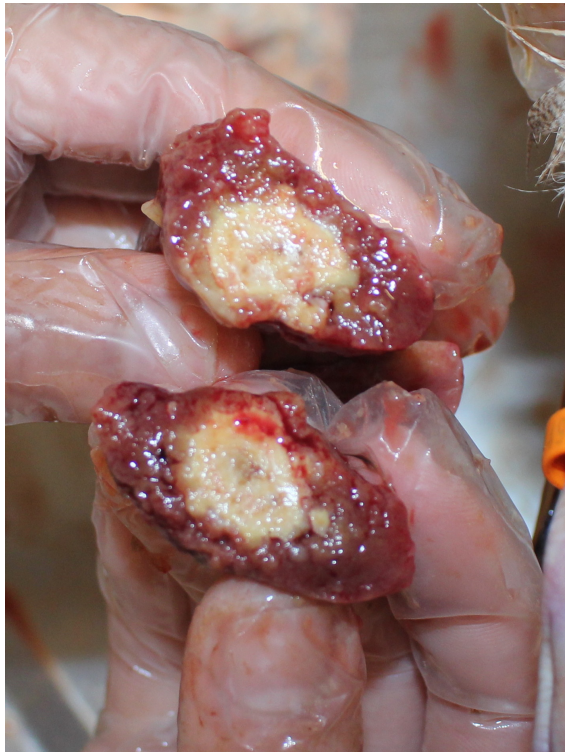


Figura 10: Presença de nódulo de grandes dimensões no fígado de uma marrequinha-americana suspeita de ter tuberculose aviária.



Figura 11: Presença de líquido ascítico na cavidade abdominal e torácica.

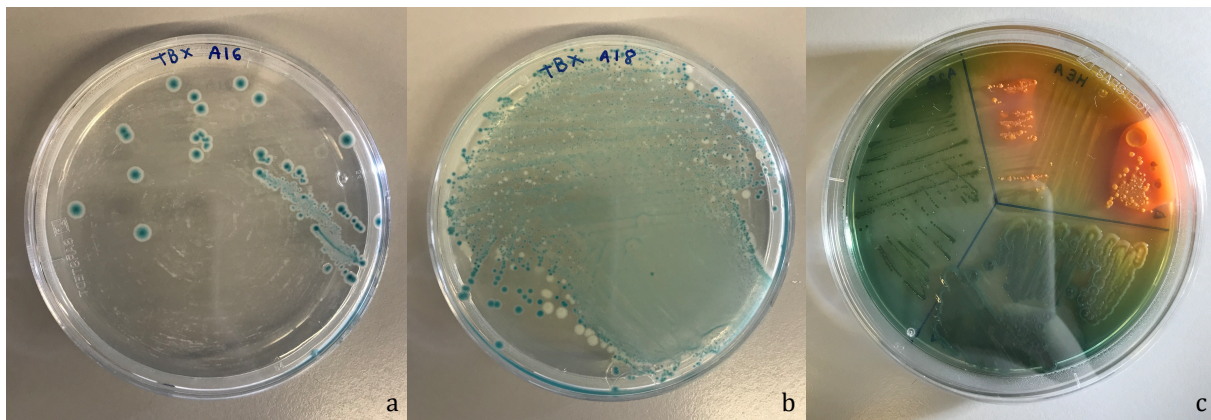


Figura 12: Colónias de *E. coli* em TBX (a e b), e placa de HEA (c) onde se observa a diferença entre as colónias lactose-positivas de *E. coli* (laranja) e colónias lactose-negativas (verde), de outras Enterobacteriaceae.

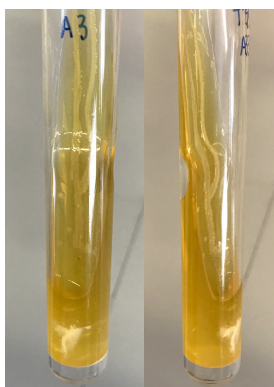


Figura 13: *E. coli* em meio TSI. A coloração atesta a reação glucose positivo (fundo do tubo), lactose-positivo (rampa) e a produção de gás

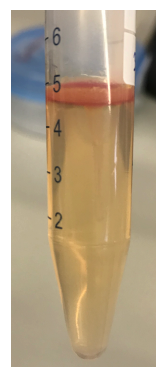


Figura 14: Reações típicas de *E. coli* em meio MIU.

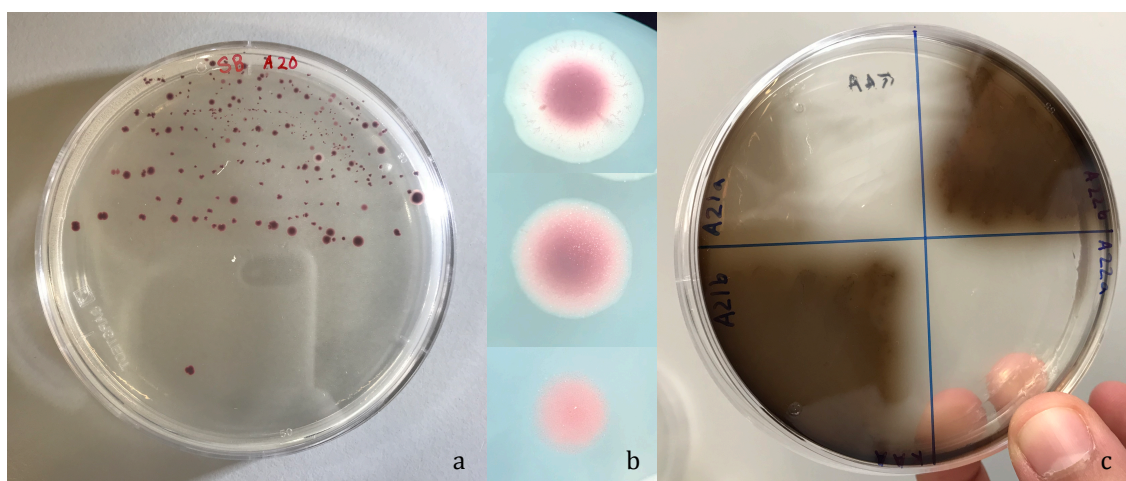


Figura 15: Isolamento de *Enterococcus* spp.: placa de SB com três colónias diferentes de cor avermelhada (a), pormenor das colónias (b) e reação esculina-positiva em meio KAA (c).

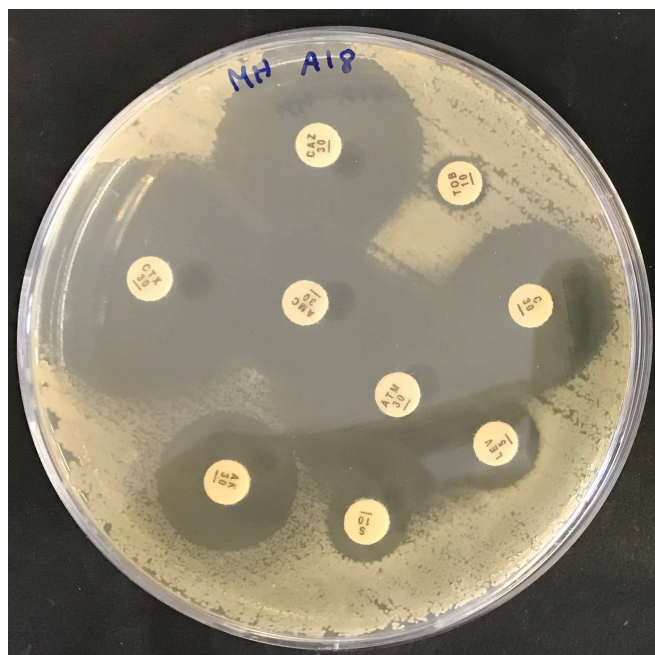


Figura 16: Teste de suscetibilidade antimicrobiana através do método de difusão em agar; isolados de *E. coli*.

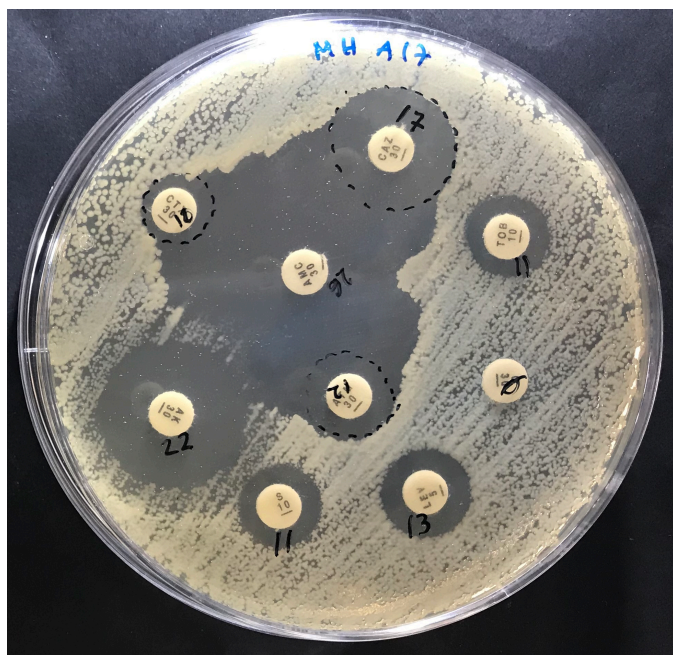


Figura 17: *E. coli* ESBL; deformação típica dos halos de inibição dos antibióticos beta-lactâmicos na presença de ácido clavulânico.

	CÓDIGO	IDADE	ORIGEM	CAUSA	DIAS NO CERVAS	DIAS ATÉ PROCESSAMENTO DA AMOSTRA	RECOLHA DA AMOSTRA	ALIMENTAÇÃO	HABITAT	FENOLOGIA
Ciconiiformes										
Cegonha-branca (Ciconia ciconia)	A24	A	Coimbra	Trauma	1	próprio dia	Tubo Stuart	Rãs, insetos, cobras, pequenas aves, lixo	Campos de cultivo, terras alagadas, tolera proximidade ao homem	Residente, Invernante e Migrador de passagem
Accipitridae										
Grifo (Gyps fulvus)	A37	A	Guarda	Atropelamento	2	2	Tubo Stuart	Necrófago	Áreas montanhosas	Residente e Migrador de passagem
Milhafre-preto (Milvus migrans)	A29	A	Viseu	Cativeiro ilegal	aprox 1 ano	16	Zaragatoa estéril seca	Oportunistas, peixe, restos, lixo	Zonas florestais e de pastagem, zonas húmidas e perto de povoações	Estival
	A30	A	Coimbra	Cativeiro ilegal	250	16				
	A31	A	Coimbra	Trauma	234	16				
	A32	A	Coimbra	Cativeiro ilegal	341	16	Ambas			
	A18 e A33	A	Coimbra	Atropelamento	224	16				
Águia-d'asa-redonda (Buteo buteo)	A6	A	Aveiro	Trauma	1	6	Zaragatoa estéril seca	Pequenos mamíferos, aves, répteis, anfíbios, insectos e minhocas	Florestas, bosques, campos de cultivo, prados e pântanos	Residente e Migrador de passagem
	A12	A	Viseu	Trauma	47	1				
	A15	A	Viseu	Tiro	145	1				
Gavião (Accipiter nisus)	A23	A	Aveiro	Colisão com estrutura	1	próprio dia	Tubo Stuart	Aves pequenas	Florestas, parques, jardins, perto de povoações	Residente e Migrador de passagem
	A28	A	Guarda	Atropelamento	2	2				
Pandionidae										
Águia-pesqueira (Pandion haliaetus)	A13	A	Coimbra	Trauma	179	1	Zaragatoa estéril seca	Peixe	Lagos e costas de água salobra	Residente, Invernante e Migrador de passagem
Falconidae										
Peneireiro (Falco tinnunculus)	A34	A	Coimbra	Atropelamento	1	15	Zaragatoa estéril seca	Arganazes e insectos	Planícies, campos de cultivo, pântanos com bosque	Residente e Migrador de passagem
Columbidae										
Rola-truca (Streptopelia decaocto)	A26	A	Viseu	Laço/Armadilha	1	próprio dia	Tubo Stuart	Matéria vegetal, grãos	Perto de quintas, cidades, parques, jardins, campos de cereais, silos	Residente
Strigidae										
Coruja-do-mato (Strix aluco)	A3 e A16	Cria	Leiria	Queda do ninho	22	1 e 1	Ambas	Pequenos roedores e insectos	Florestas, parques, terrenos agrícolas com árvores, jardins e cidades	Residente
	A14 e A17	Cria	Coimbra	Queda do ninho	6	2 e 1	Ambas			
	A20	Cria	Aveiro	Queda do ninho	1	1	Tubo Stuart			
	A21	Cria	Porto	Queda do ninho	1	1				
	A22	Cria	Viseu	Queda do ninho	4	1				
	A35	Cria	Coimbra	Queda do ninho	21	6	Zaragatoa			
	A38	A	Guarda	Atropelamento	1	1	Tubo Stuart			
Mocho-galego (Athene noctua)	A4	A	Coimbra	Atropelamento	71	6	Zaragatoa estéril seca	Insectos, aves, anfíbios e cobras	Campos agrícolas, prados, matas, aldeias	Residente
	A5	A	Coimbra	Atropelamento	1	6				
	A36	A	Guarda	Atropelamento	5	2				
Coruja-do-nabal (Asio flammeus)	A10	A	Guarda	Trauma	510	4	Zaragatoa estéril seca	Pequenos roedores	Matos, florestas, terrenos pantanosos, prados	Invernante e Migrador de passagem
Bufo-real (Bubo bubo)	A39	A	Guarda	Eletrocussão	4	1	Tubo Stuart	Mamíferos e aves	Montanhas e florestas com escarpas íngremes	Residente
Tytonidae										
Coruja-das-torres (Tyto alba)	A7	A	Coimbra	Debilidade	77	4	Zaragatoa estéril seca	Ratos, rãs e insectos	Terrenos agrícolas, matas, jardins, aldeias	Residente
	A8	A	Aveiro	Atropelamento	18	4				
	A9	A	Coimbra	Atropelamento	163	4				
	A11	A	Coimbra	Atropelamento	288	4				
Apodidae										
Andorinhão-preto (Apus apus)	A40	A	Viseu	Desconhecida	1	1	Tubo Stuart	Insectos	Zonas urbanas, florestas, falésias	Estival e Migrador de passagem
Andorinhão-pálido (Apus palidus)	A25	A	Coimbra	Debilidade	1	próprio dia	Tubo Stuart	Insectos	Zonas urbanas e falésias junto ao litoral	Estival e Migrador de passagem
Turdidae										
Melro-preto (Turdus merula)	A27	Cria	Viseu	Queda do ninho	1	2	Tubo Stuart	Minhocas, insectos e bagas	Matas, parques, jardins	Residente
	A41	Cria	Viseu	Predação	7	próprio dia				
Corvidae										
Gralha-preta (Corvus corone)	A1 e A19	A	Viseu	Atropelamento	41	1 e 1	Ambas	Omnívora; carniça, ovos, restos, insectos, bagas, sementes	Orlas florestais, bosques, zonas agrícolas, parques	Residente
	A2	A	Viseu	Atropelamento	19	1	Zaragatoa			

Tabela 1: Animais amostrados por família taxonómica²⁹. A vermelho estão os indivíduos cujas amostras não produziram resultados e a azul os indivíduos onde foram isoladas *E. coli* produtoras de ESBL.

Agente	Código	Classe		Mecanismo de ação	Espectro de ação	Espécie/gênero bacteriano alvo	Porcentagem de isolados resistentes	
							Escherichia coli	Enterococcus spp.
Ampicilina	AMP	Beta-lactâmicos	Penicilinas	Inibidores da síntese da parede celular	Gram-positivas e negativas	Escherichia coli, Enterococcus spp.	50	3
Amoxicilina + Ácido clavulânico	AMC				Gram-positivas e negativas	Escherichia coli	0	
Penicilina G	P				Gram-positivas	Enterococcus spp.		7
Imipenem	IPM		Carbapenemos		Gram-positivas e negativas	Escherichia coli	0	
Aztreonam	ATM		Monobactamos		Bacilos gram-negativos	Escherichia coli	15	
Cefazolina	KZ		Cefalosporinas		Gram-positivas e negativas	Escherichia coli	15	
Cefoxitina	FOX				Gram-positivas e negativas	Escherichia coli	0	
Ceftazidima	CAZ				Gram-positivas e negativas	Escherichia coli	15	
Cefotaxima	CTX				Gram-positivas e negativas	Escherichia coli	15	
Vancomicina	VA				Glicopéptidos	Gram-positivas	Enterococcus spp.	
Teicoplanina	TEC	Gram-positivas	Enterococcus spp.			0		
Fosfomicina	FOS		Gram-positivas e negativas	Enterococcus spp.		0		
Cloranfenicol	C	Anfenicóis	Inibidores da síntese protéica	Gram-positivas e negativas	Escherichia coli, Enterococcus spp.	20	3	
Gentamicina	CN	Aminoglicosídeos		Gram-positivas e negativas	Escherichia coli, Enterococcus spp.	15	7	
Amicacina	AK			Gram-positivas e negativas	Escherichia coli	0		
Estreptomicina	S			Gram-positivas e negativas	Escherichia coli	35		
Tobramicina	TOB			Gram-positivas e negativas	Escherichia coli	15		
Tetraciclina	TE			Tetraciclinas	Gram-positivas e negativas	Escherichia coli, Enterococcus spp.	30	50
Doxiciclina	DO	Gram-positivas e negativas			Escherichia coli, Enterococcus spp.	10	20	
Eritromicina	E	Macrólidos		Gram-positivas e negativas	Enterococcus spp.		23	
Linezolida	LZD	Oxazolidinonas		Gram-positivas	Enterococcus spp.		0	
Quinopristina + Dalfopristina	QD	Estreptograminas		Gram-positivas	Enterococcus spp.		37	
Rifampicina	RD	Rifamicinas	Interferem na síntese de ácidos nucleicos	Gram-positivas e negativas	Enterococcus spp.		23	
Ciprofloxacina	CIP	Fluoroquinolonas		Gram-positivas e negativas	Escherichia coli, Enterococcus spp.	25	13	
Levofloxacina	LEV			Gram-positivas e negativas	Escherichia coli, Enterococcus spp.	15	17	
Nitrofurantoina	F	Nitrofuranos		Gram-negativas	Escherichia coli, Enterococcus spp.	0	0	
Trimetoprim + Sulfametoxazol	SXT	Sulfonamidas		Toxoplasma gondii, Pneumocystis jirovecii	Escherichia coli	30		

Tabela 2: Antibióticos em estudo, suas classes, mecanismos e espectro de ação e percentagens de isolados resistentes à sua ação ^{14,21}.

Código	AMP	AMC	KZ	FOX	CAZ	CTX	ATM	CN	TOB	AK	S	TE	DO	CIP	LEV	SXT	C	F	IPM	ESBL	Fenótipo																						
A1	0	R	19	S	22	S	32	S	26	S	17	S	13	I	7	R	12	I	30	S	26	S	19	S	30	S	—	—	Fc1														
A5	20	S	26	S	26	S	30	S	38	S	19	S	15	S	22	S	18	S	34	S	32	S	26	S	20	I	—	—	sensível														
A6	20	S	26	S	24	S	24	S	32	S	18	S	14	I	22	S	22	S	30	S	30	S	24	S	26	S	—	—	sensível														
A8	0	R	22	S	23	S	24	S	21	S	16	I	0	R	0	R	12	I	11	R	12	R	0	R	0	R	—	—	Fc2														
A13	22	S	24	S	24	S	26	S	32	S	19	S	14	I	14	I	24	S	32	S	30	S	24	S	32	S	—	—	sensível														
A14a	22	S	24	S	17	S	18	S	32	S	22	S	16	S	16	S	24	S	34	S	36	S	25	S	19	S	33	S	—	sensível													
A16	13	R	24	S	20	S	24	S	28	S	18	S	15	S	21	S	24	S	30	S	30	S	28	S	21	S	30	S	—	Fc3													
A17	0	R	26	S	0	R	24	S	17	R	10	R	12	R	0	R	11	R	8	R	13	I	10	R	0	R	—	+	Fc4														
A18	0	R	22	S	21	S	27	S	29	S	32	S	30	S	9	R	6	R	19	S	11	R	0	R	10	R	21	S	0	Fc5													
A20	18	S	24	S	24	S	24	S	29	S	35	S	30	S	18	S	19	S	14	I	25	S	22	S	30	S	21	S	—	sensível													
A21	20	S	26	S	24	S	26	S	26	S	34	S	34	S	20	S	16	S	17	S	14	I	16	S	25	S	32	S	28	S	—	sensível											
A23a	13	R	26	S	24	S	26	S	28	S	32	S	30	S	20	S	18	S	18	S	14	I	18	S	24	S	32	S	30	S	—	Fc3											
A24b	0	R	21	S	22	S	26	S	25	S	30	S	29	S	17	S	16	S	16	I	8	R	7	R	13	I	30	S	28	S	0	Fc6											
A24c	16	I	24	S	24	S	26	S	26	S	33	S	30	S	20	S	18	S	19	S	15	S	20	S	24	S	30	S	30	S	—	sensível											
A27 (TBX + CTX)	0	R	26	S	0	R	30	S	12	R	0	R	6	R	10	R	12	R	17	S	13	I	16	S	22	S	12	R	15	I	0	R	0	R	22	S	26	S	—	+	Fc7		
A28	20	S	26	S	26	S	26	S	32	S	34	S	32	S	20	S	19	S	20	S	16	S	25	S	24	S	34	S	30	S	32	S	22	S	22	S	32	S	—	—	sensível		
A29	0	R	20	S	21	S	28	S	26	S	30	S	32	S	19	S	16	S	17	S	0	R	0	R	0	R	12	R	0	R	13	R	0	R	12	R	21	S	30	S	—	—	Fc8
A37	24	S	26	S	30	S	28	S	32	S	34	S	34	S	21	S	20	S	21	S	16	S	16	S	26	S	38	S	32	S	35	S	30	S	24	S	34	S	—	—	sensível		
A37 (TBX + CTX)	10	R	30	S	0	R	24	S	16	R	9	R	12	R	13	I	13	I	17	S	9	R	28	S	28	S	30	S	26	S	30	S	19	S	30	S	19	S	30	S	—	+	Fc9
A38	18	S	30	S	26	S	26	S	32	S	34	S	34	S	20	S	20	S	22	S	0	R	18	S	26	S	34	S	32	S	32	S	30	S	24	S	32	S	—	—	Fc10		

Tabela 3: Resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana em *Escherichia coli*. R: resistente, I: intermédio, S: sensível

Código	AMP		P	TEC		E	TE		DO		CN		CIP		LEV	F		RD		FOS		C		VAN		QD	LZD	VRE	Fenótipo					
A1	24	S	26	S	16	S	0	R	0	R	12	R	0	R	8	R	12	R	26	S	27	S	36	S	24	S	18	S	9	R	30	S	—	Fe1
A2	26	S	24	S	17	S	26	S	29	S	32	S	21	S	24	S	21	S	27	S	20	S	34	S	24	S	17	S	18	I	32	S	—	sensível
A3	13	R	13	R	19	S	7	R	8	R	14	I	26	S	15	R	10	R	30	S	32	S	26	S	26	S	17	S	16	I	30	S	—	Fe2
A6a	22	S	23	S	11	I	19	I	28	S	30	S	20	S	23	S	21	S	26	S	22	S	36	S	24	S	28	S	26	S	30	S	—	sensível
A7	22	S	23	S	16	S	22	I	32	S	29	S	19	S	23	S	21	S	27	S	16	R	32	S	25	S	18	S	17	I	29	S	—	Fe3
A12a	18	S	21	S	16	S	21	I	27	S	26	S	19	S	22	S	20	S	26	S	14	R	34	S	21	S	17	S	14	R	24	S	—	Fe4
A13	20	S	21	S	16	S	23	S	30	S	30	S	19	S	21	S	19	S	25	S	15	R	32	S	22	S	17	S	26	S	28	S	—	Fe3
A14	23	S	21	S	18	S	20	I	8	R	16	S	21	S	22	S	21	S	27	S	19	I	34	S	26	S	18	S	16	I	29	S	—	Fe5
A15	24	S	22	S	17	S	25	S	28	S	28	S	21	S	21	S	21	S	26	S	18	I	33	S	26	S	19	S	16	I	30	S	—	sensível
A16a	20	S	14	R	19	S	0	R	9	R	15	I	26	S	16	I	12	R	29	S	32	S	24	S	28	S	18	S	21	S	29	S	—	Fe6
A17	30	S	23	S	17	S	20	I	9	R	15	I	21	S	22	S	21	S	27	S	25	S	32	S	26	S	18	S	15	R	28	S	—	Fe7
A18b	32	S	21	S	17	S	0	R	0	R	13	I	0	R	11	R	12	R	29	S	23	S	—	23	S	18	S	0	R	30	S	—	Fe1	
A19a	26	S	18	S	18	S	27	S	9	R	12	R	25	S	21	S	20	S	22	S	30	S	24	S	25	S	19	S	21	S	24	S	—	Fe8
A19b	28	S	21	S	17	S	21	I	23	S	30	S	21	S	21	S	19	S	21	S	15	R	34	S	24	S	17	S	17	I	26	S	—	Fe3
A20c	28	S	22	S	17	S	21	I	10	R	16	S	22	S	21	S	21	S	25	S	17	I	34	S	24	S	17	S	14	R	29	S	—	Fe9
A23b	30	S	23	S	19	S	0	R	0	R	12	R	23	S	0	R	0	R	28	S	24	S	34	S	25	S	19	S	9	R	30	S	—	Fe1
A24c	28	S	24	S	17	S	27	S	9	R	16	S	22	S	22	S	20	S	25	S	17	I	33	S	24	S	17	S	17	I	29	S	—	Fe10
A25b	25	S	21	S	17	S	23	S	27	S	30	S	20	S	22	S	20	S	26	S	15	R	29	S	24	S	17	S	15	R	26	S	—	Fe4
A26	24	S	20	S	16	S	24	S	24	S	24	S	18	S	20	I	19	S	24	S	14	R	27	S	22	S	16	I	17	I	25	S	—	Fe3
A27	23	S	16	S	17	S	21	I	29	S	27	S	20	S	21	S	21	S	26	S	18	I	31	S	25	S	18	S	19	S	27	S	—	sensível
A28	29	S	22	S	18	S	24	S	10	R	15	I	23	S	24	S	23	S	27	S	22	S	29	S	10	R	19	S	18	I	30	S	—	Fe11
A29	22	S	21	S	15	S	0	R	0	R	11	R	19	S	19	I	18	S	24	S	20	S	30	S	21	S	17	S	10	R	26	S	—	Fe1
A30	20	S	20	S	16	S	0	R	0	R	11	R	20	S	20	I	19	S	24	S	23	S	32	S	22	S	16	I	10	R	24	S	—	Fe1
A32	20	S	21	S	16	S	21	I	0	R	10	R	21	S	22	S	19	S	23	S	20	S	32	S	24	S	17	S	12	R	26	S	—	Fe2
A33	23	S	22	S	16	S	25	S	9	R	13	I	20	S	21	S	20	S	23	S	13	R	34	S	24	S	17	S	12	R	24	S	—	Fe12
A35	22	S	21	S	16	S	27	S	25	S	24	S	18	S	21	S	20	S	25	S	18	I	34	S	24	S	16	I	17	I	25	S	—	sensível
A37b	32	S	30	S	20	S	29	S	31	S	28	S	19	S	22	S	21	S	21	S	29	S	25	S	26	S	24	S	23	S	30	S	—	sensível
A38	34	S	26	S	20	S	20	I	36	S	36	S	24	S	26	S	26	S	26	S	30	S	30	S	30	S	24	S	24	S	33	S	—	sensível
A39	34	S	28	S	20	S	24	S	35	S	38	S	20	S	25	S	26	S	27	S	29	S	38	S	27	S	21	S	22	S	32	S	—	sensível
A41	30	S	24	S	18	S	22	I	34	S	28	S	19	S	23	S	24	S	26	S	22	S	29	S	28	S	19	S	20	S	30	S	—	sensível

Tabela 4: Resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana em *Enterococcus spp.*. R: resistente, I: intermediário, S: sensível